

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JONATHAN DAVID AGUDELO GALEANO

ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR ETANÓLISE DO ÓLEO DE
PALMA CATALISADA POR SÓLIDOS FERMENTADOS DE *Rhizopus microsporus* E
DE *Burkholderia contaminans*

CURITIBA

2016

JONATHAN DAVID AGUDELO GALEANO

ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR ETANÓLISE DO ÓLEO DE
PALMA CATALISADA POR SÓLIDOS FERMENTADOS DE *Rhizopus microsporus* E
DE *Burkholderia contaminans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Nadia Krieger

Co-orientador: Prof. Dr. David Mitchell

CURITIBA

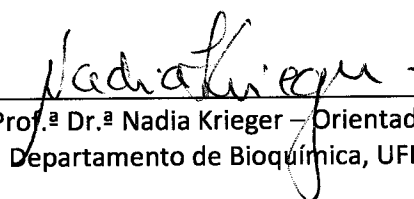
2016

TERMO DE APROVAÇÃO

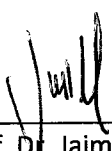
JONATHAN DAVID AGUDELO GALEANO

ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR ETANÓLISE DO ÓLEO
DE PALMA ATRAVÉS DOS SÓLIDOS FERMENTADOS DE *Rhizopus*
microsporus E DE *Burkholderia contaminans*

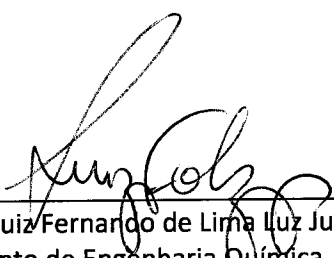
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre
no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof.ª Dr.ª Nadia Krieger – Orientadora
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof. Dr. Jaime Paba Martinez
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof. Dr. Luiz Fernando de Lima Luz Junior
Departamento de Engenharia Química, UFPR

Curitiba, 24 de fevereiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Noralba Galeano, pela minha vida, pelo incondicional apoio e por me mostrar cada dia com seu exemplo que a verdadeira e maior força para viver vem do amor da família.

À minha irmãzinha-filha Ana María, cuja ternura e amor não têm palavras no mundo para ser descritas, simplesmente alimentam a minha alma e me dão as forças para sair na frente de tudo.

À minha grande família de colombianos em Curitiba, especialmente o Ronald Pacheco, Nefer Gomez, Sandra Parra e Alex Tovar, porque mesmo a 6928 km de nosso país, com as nossas conhecidas festas latinas e reuniões sempre me senti como em casa.

À minha avó brasileira, a senhora Eloisa Souza, que me acolheu na sua casa os primeiros meses quando cheguei a Curitiba e porque sempre esteve presta a me ajudar e compartilhar cafés e boas histórias.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB), particularmente ao grandão Robson Alnoch, à Luana Pitol, ao Jeferson Richter e por seu companheirismo e gentileza em qualquer momento. À grande Michelle Moreira, porque se tornou uma boa amiga, sempre disposta a me escutar, apoiar e aconselhar, e por suas agradáveis conversas nos longos dias de trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Carboidratos, à Ana Flavia, à Helyn Barddal e aos “gvones” Yony Roman e Pedro Chavez, pelo grande apoio e principalmente porque visitá-los no laboratório sempre foi a melhor opção para ganhar sorrisos e alegrar os meus dias.

À aluna de Iniciação Científica Isadora Koller por participar ativamente, com perseverança e dedicação no desenvolvimento de experimentos preliminares.

À fundação Casa do Estudante Universitário (CEU) de Curitiba, porque foi meu lar e meu centro de estudo, de futebol e de boas amizades brasileiras e estrangeiras.

À minha orientadora, a Profa. Dra. Nadia Krieger e ao meu co-orientador, o Prof. Dr. David A. Mitchell, pela confiança e autonomia de pesquisa que me permitiram.

Aos professores Dr. Jaime Paba e Dr. Luiz Fernando de Lima Luz, por gentilmente terem aceitado o convite para participação da banca examinadora desta dissertação e pelas valiosas correções e sugestões ao texto do trabalho.

Ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, por me abrir as portas para entrar a ser parte desta honorável família acadêmica.

À Organização dos Estados Americanos (OEA) e ao Grupo Coimbra das Universidades Brasileiras (GCUB), por terem me selecionado e patrocinado para cursar meu mestrado no Brasil.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa e auxílio financeiro.

A todos aqueles que passaram nesta linda etapa da minha vida, de forma direta ou indiretamente, deixando-me alguma boa lembrança, especialmente minha linda Kescelin Oliveira.

MUCHAS GRACIAS!!

*“A vida não é a que se viveu, senão a que nos
lembramos e como a lembramos para contá-la”*

Grabriel García Márquez

RESUMO

O biodiesel é a principal alternativa ambientalmente correta para a substituição parcial ou total do Diesel obtido do petróleo, principalmente porque pode ser produzido a partir de fontes renováveis de óleos mediante reações de transesterificação. Embora o biodiesel seja convencionalmente produzido por catálise alcalina, o processo enzimático com lipases produzidas a baixo custo é de crescente interesse. Sólidos fermentados contendo lipases imobilizadas naturalmente de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (RMFS) e de *Burkholderia contaminans* LTEB11 (BCFS) foram obtidos por fermentação em estado sólido, usando bagaço de cana umedecido com uma solução nutriente mineral contendo óleo de soja como indutor. Estes sólidos foram secos, caracterizados e usados diretamente como biocatalisadores na transesterificação do óleo de palma em sistema livre de solvente. A reação de etanolise foi pré-otimizada em frascos de 25 mL, contendo 14,52 g de óleo de palma e 192 U de atividade hidrolítica das lipases dos sólidos fermentados. Para melhorar os rendimentos da reação, as estratégias avaliadas foram: (a) misturas dos sólidos fermentados em três proporções diferentes (3:1, 1:1 e 1:3, com relação às unidades de atividade de hidrólise), (b) adição de etanol em etapas e (c) reações realizadas em dois estágios, eliminando-se o glicerol adsorvido no sólido fermentado por lavagens com *tert*-butanol ou substituindo-o por um novo sólido fermentado. Obteve-se por ambas as estratégias, conversões máximas de 90 e 54% para BCFS e RMFS respectivamente, em 48 h. Os ensaios feitos com misturas dos sólidos não aumentaram o rendimento da reação. FSBC, em comparação com RMFS, mostrou uma menor inibição por etanol, maior produção de glicerol e menor inativação por produtos e subprodutos adsorvidos sobre o sólido. Os ensaios em reator de leito empacotado com BCFS em modo descontínuo em um sistema de circuito fechado produziu um máximo de conversão de 89,3% em 30 h, a uma razão molar etanol:óleo de 5,5:1, com quatro adições de etanol e com 12% de sólido em relação ao óleo de palma. As duplas lavagens sequenciais com *n*-hexano e *tert*-butanol foram a melhor opção para recuperar a eficiência dos sólidos e permitir assim, no caso do BCFS em reator de leito empacotado, um reuso de 5 ciclos de reação com 74% de conversão relativa. Estes resultados são promissores e podem dar novas ideias sobre o planejamento e otimização do uso dos sólidos fermentados como biocatalisadores na síntese de biodiesel.

Palavras-chave: Fermentação no estado sólido, lipases, biodiesel, óleo de palma, sólidos fermentados, etanolise, *Rhizopus microsporus*, *Burkholderia contaminans*.

ABSTRACT

Biodiesel is the main environmentally friendly alternative for the partial or total replacement of the Diesel obtained from petroleum, principally because it can be produced from renewable oils through transesterification reactions. Although biodiesel is conventionally produced by alkaline catalysis, the enzymatic process with lipases produced at low cost is of increasing interest. Fermented solids containing naturally immobilized lipases from *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (RMFS) and *Burkholderia contaminans* LTEB11 (BCFS) were obtained by solid-state fermentation, using sugarcane bagasse moistened with a mineral nutrient solution containing soybean oil as an inducer. These solids were dried, characterized and used directly as biocatalysts in the transesterification of the palm oil in a solvent-free system. The ethanolysis reaction was pre-optimized in vials flasks of 25 mL, containing 14,52 g of palm oil and 192 U of lipase hydrolytic activity of the fermented solids. To improve the yields of the reaction, the strategies evaluated were: (a) mixtures of fermented solids in three different proportions (3:1, 1:1 and 1:3 with respect to the hydrolysis activity units), (b) ethanol stepwise addition and (c) reactions performed in two stages, eliminating the glycerol adsorbed onto the fermented solid by washing it with *tert*-butanol or replacing it by a fresh fermented solid. It was obtained, by both strategies, maximum conversions of 90% and 54% for BCFS and RMFS respectively, in 48 h. The assays done with mixtures of solids did not increase the yields of the reaction. BCFS, compared to RMFS, showed less inhibition by ethanol, higher production of glycerol and less inactivation by products and by-products adsorbed on the solid. Assays in a packed-bed reactor (PBR) with BCFS in discontinuous mode in a closed-loop system produced a maximum conversion of 89,3% in 30 h, at a molar ratio ethanol:oil of 5,5:1 with four ethanol additions and with 12% of solid in relation to the palm oil. The dual sequential washings with *n*-hexane and *tert*-butanol were the best option to recover the solid efficiency and thus allow, in the case of BCFS in PBR, a reuse for 5 reaction cycles, with 74% of relative conversion. These results are promising and can give new insights on planning and optimizing the use of fermented solids as biocatalysts in biodiesel synthesis.

Keywords: Solid-state fermentation, lipases, biodiesel, palm oil, fermented solids, ethanolysis, *Rhizopus microsporus*, *Burkholderia contaminans*.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO E MATERIAL SUPLEMENTAR

FIGURA 1 – ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO PARA SÍNTESE DE BIODIESEL.	20
FIGURA 2 – REAÇÃO NATURAL DE HIDRÓLISE E REAÇÕES DE SÍNTESE EM CONDIÇÕES AQUO-RESTRITAS CATALISADAS POR LIPASES.....	24
FIGURA 3 – MODELO ESTRUTURAL DO DOBRAMENTO α/β HIDROLASE	25
FIGURA 4 – ESQUEMA DE METANÓLISE COM LIPASE EM SISTEMA MACROAQUOSO.....	29
FIGURA 5 – PROPOSTA DE MECANISMO TIPO <i>PING PONG Bi Bi</i> PARA A ALCOÓLISE DE TRIACILGLICERÍDEOS EM SISTEMA MICROAQUOSO EM MEIO ORGÂNICO.....	30
FIGURA 6 – ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASES NÃO-ESPECÍFICAS, <i>sn</i> -1,3-ESPECÍFICAS E <i>sn</i> -1,3-ESPECÍFICAS COM MIGRAÇÕES QUÍMICAS DO GRUPO ACILA <i>sn</i> -2.	32
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA DE REATOR EM COLUNA DE LEITO EMPACOTADO EM MODO DESCONTÍNUO USADO PARA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO.....	34
FIGURA 8 – ESQUEMA DO EFEITO SINÉRGICO DAS LIPASES <i>sn</i> -1,3-ESPECÍFICAS E NÃO-ESPECÍFICAS NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO	41
FIGURA 9 – ESTRATÉGIA EMPREGADA NESTE TRABALHO.....	47
FIGURA 10 – ESQUEMA DOS POSSÍVEIS GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NAS LIPASES, PAREDE CELULAR, SUPORTE E POLIETILENIMINA QUE PODEM REAGIR COM GLUTARALDEÍDO DURANTE O ENTRECRUZAMENTO DAS LIPASES E CÉLULAS INTEIRAS NO SÓLIDO FERMENTADO.	98

FIGURA 11 – SDS-PAGE DOS FILTRADOS DAS DUAS PRIMEIRAS LAVAGENS DO EXPERIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO POR TRATAMENTO COM GLUTARALDEIDO NO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Rhizopus microsporus</i>	102
--	-----

MANUSCRITO

Fig. 1. Stability of lipase activity in the fermented solids of <i>Rhizopus microsporus</i> and <i>Burkholderia contaminans</i> during the storage in sealed plastic bags at -4 °C.....	62
Fig. 2. Effect of ethanol stepwise addition on the kinetics of ethanolysis of palm oil catalyzed by the fermented solids of <i>Rhizopus microsporus</i> and <i>Burkholderia contaminans</i> with molar ratio ethanol:oil 3:1 and 4.5:1.....	64
Fig. 3. Effect of the mixture of the fermented solids of <i>Rhizopus microsporus</i> and <i>Burkholderia contaminans</i> on the kinetics of ethanolysis of palm oil with molar ratio ethanol:oil 3:1, with ethanol addition in two steps.....	66
Fig. 4. Second cycle of the ethanolysis of palm oil with the fermented solids of <i>Rhizopus microsporus</i> , <i>Burkholderia contaminans</i> and the mixture of solids after different washing procedures.....	69
Fig. 5. Ethanolysis of palm oil with the fermented solids of <i>Rhizopus microsporus</i> and <i>Burkholderia contaminans</i> with an intermediate step for glycerol removal.....	70
Fig. 6. Ethanolysis of palm oil in two stages with replacement of the fermented solids of <i>Rhizopus microsporus</i> and <i>Burkholderia contaminans</i> after a first stage by a fresh batch of fermented solids.....	71
Fig. 7. Effect of ethanol stepwise additions on the ethanolysis of palm oil with the fermented solids of <i>Rhizopus microsporus</i> and <i>Burkholderia contaminans</i> in packed-bed reactor.....	73
Fig. 8. Cycles de reuse of the fermented solids of <i>Burkholderia contaminans</i> in the ethanolysis of palm oil, with washings in <i>n</i> -hexane and <i>tert</i> -butanol after the reaction, and with <i>n</i> -hexane by three cycles and final whasing with <i>n</i> -hexane and <i>tert</i> -butanol after the fourth cycle.....	74

LISTA DE TABELAS

REVISÃO E MATERIAL SUPLEMENTAR

TABELA 1 – COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO DE PALMA, BIODIESEL E DIESEL.....	22
TABELA 2 – ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS POR TRANSESTERIFICAÇÃO E POR ESTERIFICAÇÃO EM SISTEMAS LIVRES DE SOLVENTE, UTILIZANDO LIPASES DE SÓLIDOS FERMENTADOS DE <i>Rhizopus microsporus</i> E DE <i>Burkholderia contaminans</i>	36
TABELA 3 – ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE ÓLEO DE PALMA UTILIZANDO LIPASES.....	44
TABELA 4 – PROTEÍNA TOTAL LIXIVIADA E ATIVIDADES LIPOLÍTICAS RESIDUAIS DOS SÓLIDOS FERMENTADOS DE <i>Rhizopus microsporus</i> E <i>Burkholderia contaminans</i> , APÓS LAVAGENS DOS TRATAMENTOS COM POLIETILENIMINA E GLUTARALDEÍDO.....	101
TABELA 5 – PROTEÍNA TOTAL LIXIVIADA E ATIVIDADE HIDROLÍTICA RESIDUAL DOS SÓLIDOS FERMENTADOS DE <i>Rhizopus microsporus</i> E <i>Burkholderia contaminans</i> COM POLIETILENIMINA DURANTE A FERMENTAÇÃO, APÓS LAVAGENS DO TRATAMENTO COM GLUTARALDEÍDO.....	104

MANUSCRITO

Table 1. Solid state fermentation standardized conditions for <i>Rhizopus microsporus</i> and <i>Burkholderia contaminans</i> and lipase hydrolytic and esterification activities of the fermented solids.....	61
Table 2. Effect of the mass of the fermented solids of <i>Rhizopus microsporus</i> and <i>Burkholderia contaminans</i> in the percentage conversion of palm oil in shake flasks.....	63
Table 3. Glycerol and ethanol contents during the ethanolysis of palm oil with the fermented solids of <i>Rhizopus microsporus</i> and <i>Burkholderia</i>	

<i>contaminans</i> and their distribution between the reaction medium and the fermented solid.....	68
---	----

Table 4. Studies of the biodiesel production by transesterification of palm oil with lipases in solvent free medium.....	77
--	----

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

REVISÃO E MATERIAL SUPLEMENTAR

AGBS	- Ácidos graxos da borra de soja
AGOP	- Ácidos graxos de óleo de palma
AGL	- Ácidos graxos livres
AM	- Acetato de metila
ANP	- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AOCS	- <i>American Oil Chemist's society</i>
a_w	- Atividade da água
BC	- Bagaço de cana
BCFS	- <i>Fermented solid produced by Burkholderia contaminans</i>
CNPE	- Conselho Nacional de Política Energética (Brasil)
CPQBA	- Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DAG	- Diacilglicerídeos
EMe	- Ésteres metílicos
FA	- Frascos agitados
FES	- Fermentação em estado sólido
FSm	- Fermentação submersa
FSG	- Farinha de semente de girassol
G	- Glicerol
LTEB	- Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise
MAG	- Monoacilglicerídeos
NPDEAS	- Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto-Sustentável
OP	- Óleo de palma
OPB	- Óleo de palma bruto
OPR	- Óleo de palma residual de cozinha
OS	- Óleo de soja
PBR	- <i>Packed-Bed Reactor</i>
POS-APV	- Polissiloxano-álcool polivinílico
PSB	- Partículas de suporte de biomassa
RMFS	- <i>Fermented solid produced by Rhizopus microsporus</i>

SF	- Sólido fermentado
STR	- <i>Stirred tank reactor</i>
TAG	- Triacilglicerídeo
SDS-PAGE	- <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>

MANUSCRITO

BCFS	- Fermented solid produced by <i>Burkholderia contaminans</i>
BSP	- Biomass support particles
DS	- Dry fermented solid
EDTA	- Ethylene-diamine-tetraacetic acid
FAEE	- Fatty acid ethyl esters
FAME	- Fatty acid methyl esters
FFA	- Free fatty acids
GA	- Glutaraldehyde
GC	- Gas chromatography
HPLC	- High-Performance Liquid Chromatography
LB	- Luria Bertani medium
LTEB	- <i>Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise</i>
MA	- Methyl acetate
PBR	- Packed-Bed Reactor
PDA	- Potato dextrose agar
PO	- Palm oil
POS-PVA	- Polysiloxane –poly(vinyl) alcohol
RMFS	- Fermented solid produced by <i>Rhizopus microsporus</i>
RRF	- Relative response factor
RID	- Refractive index detector
SCB	- Sugarcane bagasse
SmF	- Submerged fermentation
SF	- Shake Flasks
SSF	- Solid-state fermentation
TLC	- Thin layer chromatography

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 BIODIESEL.....	19
2.1.1 Biodiesel como alternativa ao Diesel de petróleo.....	19
2.1.2 Produção de biodiesel.....	20
2.1.3 Biodiesel do óleo de palma	22
2.2 LIPASES.....	23
2.2.1 Definição e reações de lipases	23
2.2.2 Estrutura das lipases.....	25
2.2.3 Produção de lipases por fermentação em estado sólido.....	26
2.2.4 Lipases de <i>Burkholderia contaminans</i> e de <i>Rhizopus microsporus</i>	27
2.3 PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR LIPASES	29
2.3.1 Modelos da reação de alcóólise catalisada por lipases	29
2.3.2 Reatores	33
2.3.3 Utilização de sólidos fermentados contendo lipases como catalisadores	34
2.3.4 Os problemas da reação de alcoólise catalisada por lipases e as estratégias básicas para resolvê-los	37
2.3.5 Combinação de lipases na síntese do biodiesel	40
2.3.6 Produção enzimática de biodiesel de óleo de palma	42
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	45
3.1 OBJETIVO GERAL.....	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4. MANUSCRITO.....	47
Abstract.....	49
4.1 Introduction	50
4.2 Materials and methods	52

4.2.1	Reagents and media	52
4.2.2	Strains and Inoculum	53
4.2.3	Solid-state fermentation	53
4.2.4	Characterization of the fermented solids	54
4.2.5	Ethanolysis reactions in shake flasks	55
4.2.6	Washings of the fermented solids and their reuse in cycles of ethanolysis reactions.....	56
4.2.7	Ethanolysis reactions in packed-bed reactor.....	56
4.2.8	Analytical methods	57
4.3	Results.....	60
4.3.1	Production and characterization of the fermented solids.....	60
4.3.2	Ethanolysis reactions in shake flasks.....	62
4.3.3	Ethanolysis reactions in packed-bed reactor.....	72
4.4	Discussion	75
4.5	Conclusions	81
	Acknowledgments.....	82
	References.....	82
5.	CONCLUSÕES.....	86
6.	PERSPECTIVAS	88
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
8.	MATERIAL SUPLEMENTAR	97
8.1	ESTUDOS PRELIMINARES DE IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES E CÉLULAS INTEIRAS NOS SÓLIDOS FERMENTADOS	97
8.1.1	Metodologia.....	99
8.1.2	Resultados e discussão	100
8.1.3	Conclusões	104
	ANEXOS	105

1. INTRODUÇÃO

Devido ao aumento da demanda por fontes alternativas de energia e das constantes preocupações ambientais relacionadas aos combustíveis fósseis (LEUNG et al., 2010), o biodiesel se posiciona como a principal alternativa ambientalmente favorável para a substituição do diesel. O biodiesel é renovável, biodegradável, possui propriedades similares ao diesel, incluindo uma maior eficiência de combustão, e apresenta um perfil de menor emissão de gases de efeito estufa, enxofre e material particulado durante a combustão (SCHUMACHER et al., 1996; LEUNG et al., 2010; CHRISTOPHER et al., 2014). O biodiesel é composto de uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa e é tipicamente produzido a partir de fontes renováveis como óleos vegetais, assim como de gorduras animais, inclusive óleos residuais de cozinha (LOURINHO; BRITO, 2015). Dentre todas as matérias-primas oleaginosas disponíveis, o óleo de palma aparece como uma alternativa viável como matéria-prima que poderia ser responsável pela maior parte da produção de biodiesel, já que é abundante, fornece quase um terço da produção mundial de óleos vegetais e apresenta baixos custos de produção (KUSS et al., 2015). Convencionalmente, é produzido biodiesel por catálise alcalina homogênea em reações de transesterificação (alcoólise) de óleos vegetais, já que altas velocidades de reação e elevados rendimentos de produção são obtidos. No entanto, este processo tem alguns inconvenientes, como o maior consumo de energia, a dificuldade da remoção do catalisador, a necessidade de tratamento de águas residuais alcalinas e o fato de usar matérias-primas de elevada qualidade, e a complicada separação e purificação do biodiesel. Devido a isto, o processo enzimático com lipases (E.C. 3.1.1.3) tornou-se a principal tentativa ecologicamente atraente para produzir um biodiesel limpo e glicerol de alta qualidade.

Os principais estudos em biocatálise com lipases focam em reduzir ou compensar o alto custo das lipases, melhorar as velocidades de reação e diminuir a inibição e inativação causada pelo álcool e pela adsorção do glicerol sobre a lipase imobilizada (LEUNG et al., 2010; GOG et al., 2012; LOURINHO; BRITO, 2015). Têm sido desenvolvidos métodos inovadores por fermentação em estado sólido (FES) sobre substratos com suportes porosos de baixo custo (como resíduos agroindustriais), para a obtenção de lipases extracelulares e células inteiras de fungos e bactérias,

imobilizadas naturalmente por adsorção no suporte durante a fermentação. Os sólidos fermentados podem ser utilizados diretamente no meio reacional para catalisar reações de esterificação, transesterificação (metanólise ou etanólise) e hidroesterificação, para a produção de biodiesel (CORDOVA et al., 1998; FERNANDES et al., 2007; SALUM et al., 2010; AGUIEIRAS et al., 2014; LIU et al., 2014; ZAGO et al., 2014).

No grupo de Tecnologia Enzimática e Biocatálise da UFPR foram produzidos sólidos fermentados por cultivos com *Burkholderia cepacia* LTEB11 (atualmente *B. contaminans*), utilizando uma mistura 1:1 (em massa) do bagaço de cana e farelo de semente de girassol como substrato. O sólido fermentado foi utilizado em um reator de leito empacotado em sistema livre de solventes para a etanólise do óleo de soja, obtendo-se 95% de conversão em 46 h (SALUM et al., 2010). Por outro lado, Zago et al. (2014) produziram sólidos fermentados com *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM por FES com bagaço de cana impregnado com uma emulsão contendo óleo de soja e meio de cultivo. A etanólise de óleo de milho com este sólido fermentado em reator de leito empacotado atingiu somente uma conversão de 68% em 72 h. No entanto, ambos os sólidos produzem conversões máximas em tempos ainda muito elevados, e as diferenças em conversões entre esses sólidos poderiam ser atribuídas às diferenças de regioseletividade entre as lipases de cada micro-organismo.

Por outro lado, a possibilidade de reutilização dos sólidos fermentados parece estar limitada pela inativação causada pelo etanol e pelo glicerol retido no sólido. Nesse sentido, o presente trabalho visa estudar estratégias que proporcionem as mais altas conversões possíveis no menor tempo de reação e que permitam maiores possibilidades de reuso dos sólidos fermentados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIODIESEL

2.1.1 Biodiesel como alternativa ao Diesel de petróleo

O biodiesel apresenta-se como uma alternativa ambientalmente correta para a substituição total e, por enquanto, parcial do Diesel convencional. No Brasil, por exemplo, foi estabelecido pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) desde novembro de 2014, que o óleo Diesel comercializado em todo o país contenha 7% de biodiesel. O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual, em 2013, de 2,9 bilhões de litros e uma capacidade instalada, no mesmo ano, para cerca de 7,9 bilhões de litros. Atualmente, conta com 55 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2015)

Quimicamente, o biodiesel é um combustível composto de uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa e é tipicamente produzido a partir de fontes renováveis como óleos vegetais, gorduras animais e óleos residuais de cozinha (LOURINHO; BRITO, 2015). Mais de 95% da produção do biodiesel vêm de óleos comestíveis e isto pode causar alguns problemas, tais como a competição com o mercado de óleo comestível, o que aumenta o custo destes óleos e do biodiesel (LEUNG et al., 2010). No entanto, dezenas de espécies vegetais presentes no Brasil podem ser usadas na produção do biodiesel. Dentre elas, a soja, palma, girassol, babaçu, amendoim, mamona e pinhão-manso. No Brasil, o óleo de soja é o mais usado na produção de biodiesel. Em novembro de 2014, este óleo foi responsável por 74,3% da produção de biodiesel (ANP, 2015). Contudo, o uso, nesse processo, de matérias-primas refinadas, com baixo índice de acidez, apresenta a desvantagem de fazer com que o custo da matéria-prima seja responsável por 60 a 80% do custo total de produção (LEUNG et al., 2010; HAMA; KONDO, 2013).

O biodiesel pode ser utilizado em qualquer motor de ignição por compressão, sem a necessidade de modificação e não somente tem propriedades semelhantes ao Diesel, mas tem vantagens com relação a este, tais como: a) maior eficiência de combustão ou índice de cetano (TABELA 1); b) é renovável e mais de 90% podem ser

biodegradados em 21 dias; c) menor conteúdo de compostos de enxofre e aromáticos; d) redução de três vezes o volume de gases tóxicos ou de efeito estufa emitidos durante sua combustão, com exceção dos níveis de óxidos de nitrogênio (NO_x). Estas vantagens podem ajudar a diminuir o risco do aquecimento global (ALI et al., 1995; SCHUMACHER et al., 1996; LEUNG et al., 2010; CHRISTOPHER et al., 2014).

2.1.2 Produção de biodiesel

O método convencionalmente utilizado para produção de biodiesel é através da transesterificação (FIGURA 1) entre gorduras animais ou óleos vegetais e álcoois de cadeia curta (alcoólise) por catálise alcalina homogênea (NaOH , KOH), já que este proporciona cinéticas favoráveis de reação e altos rendimentos de biodiesel (>96%) (MA; HANNA, 1999; LEUNG et al., 2010).

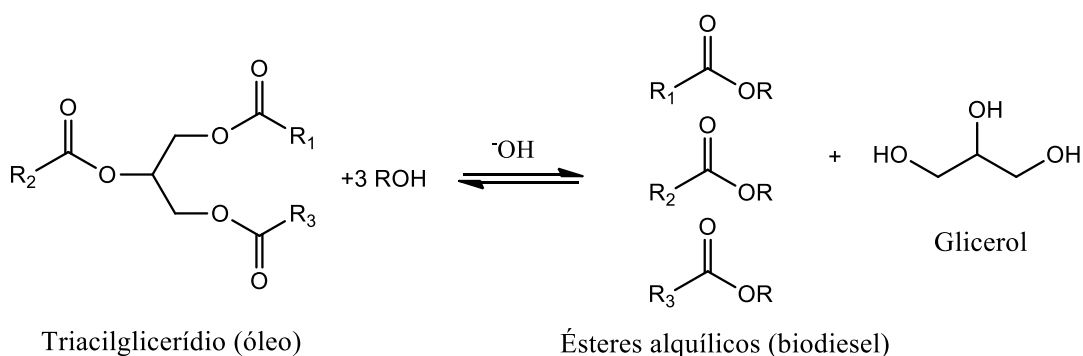


FIGURA 1 — ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO PARA SÍNTESE DE BODIESEL.

$\text{R}_{1,2,3}$: cadeias longas de ácido graxo, R: cadeia alquílica curta

FONTE: Adaptado de Leung et al. (2010)

No entanto, o processo de transesterificação alcalina tem algumas desvantagens como a dificuldade de remover o catalisador, a necessidade do tratamento de efluentes alcalinos, o consumo excessivo de energia, a complexa recuperação do glicerol, o uso de matérias-primas com baixos níveis de umidade e de ácidos graxos livres. A água presente no material de partida pode hidrolisar os triacilglicerídeos (TAG) a ácidos graxos livres (AGL), os quais, por saponificação, consomem o catalisador, formando sabões, que por sua vez, podem emulsionar os produtos, dificultando a separação do glicerol (MA; HANNA, 1999; VÉRAS et al., 2011; GOG et al., 2012; LOURINHO;

BRITO, 2015). Rotas alternativas para a produção de biodiesel têm sido estudadas, como o processo enzimático (catálise heterogênea), que oferece uma opção ecologicamente mais atraente, por gerar menos produtos residuais, possuir menos etapas de purificação, tanto do biodiesel como do glicerol, ser altamente seletivo, envolver condições suaves de reação ou de menor consumo energético, alta recuperação do catalisador e possibilidade de usar matérias-primas com altos teores de água e AGL (AKOH et al., 2007; GOG et al., 2012). No entanto, o processo enzimático ainda não foi adotado mundialmente na indústria, devido principalmente a desvantagens como o alto custo das lipases, à sua perda de atividade durante ciclos de reação e às menores produtividades devido às baixas velocidades de reação. Devido a isto, muitos trabalhos em escala laboratorial continuam focados na superação e eliminação destas desvantagens.

Uma estratégia alternativa para a utilização de matérias-primas de baixo custo com quantidades significativas de água e AGL é o processo de hidroesterificação. Este processo envolve duas etapas: primeiro, a hidrólise dos TAG e, segundo, a esterificação dos AGL com o álcool, formando ésteres alquílicos e água como subproduto. O glicerol obtido na primeira etapa é separado e não entra em contato com o álcool, sendo, portanto, mais puro do que o obtido por transesterificação (SOARES et al., 2013)

Geralmente, durante a reação de alcoólise, utiliza-se um álcool de cadeia curta, como o metanol, etanol, propanol, butanol e álcool amílico, sendo o metanol o industrialmente mais empregado, tendo em vista de que é mais barato, mais reativo e apresenta maior polaridade. Visto que o objetivo principal da alcoólise é a redução da viscosidade e aumento da volatilidade do óleo ou da gordura, a utilização do metanol apresentaria outra vantagem, que é o fato de que ésteres metílicos de ácidos graxos serem mais voláteis quando comparados aos ésteres etílicos. Porém, o metanol, comparado ao etanol, é mais tóxico, vem de origem fóssil não renovável e tem maior risco de explosão pelo seu baixo ponto de ebulição. O etanol é uma alternativa que deveria ser mais considerada, porque pode aliar sua baixa toxicidade com a disponibilidade a partir de fontes renováveis (MA; HANNA, 1999; LEUNG et al., 2010).

2.1.3 Biodiesel do óleo de palma

A palma é a oleaginosa de valor econômico mais produtiva de que se tem conhecimento, pois fornece quase um terço da produção global de óleos vegetais. Sua produtividade média de 4 toneladas de óleo por hectare/ano é dez vezes maior que a do óleo de soja, por exemplo. Ou seja, ele é mais competitivo no mercado mundial do que os produtos similares, portanto seu preço também é menor. A Malásia e a Indonésia são responsáveis por 85% da produção mundial, enquanto que Tailândia, Colômbia, Nigéria, Papua Nova Guiné e Equador representam juntas 6,6% da produção mundial. O saldo de 8,4% divide-se entre outros 36 países, incluindo o Brasil. Mesmo que o Brasil esteja longe de ser considerado um grande produtor do óleo de palma, a cultura do óleo de palma pode ter importante papel na redução da pobreza das regiões produtoras desde que seja bem orientada, seguindo os critérios sociais e ambientais exigidos pela legislação brasileira e pelos modernos critérios internacionais de sustentabilidade (ABRAPALMA, 2015).

Óleos de palma apresentam na média 87% de triacilglicerídeos, 6% de diacilglicerídeos, 2% monoacilglicerídeos, 5% ácidos graxos livres (NIELSEN et al., 2008). A transformação de óleo de palma a biodiesel se baseia na diminuição da densidade e da viscosidade cinemática (TABELA 1). Devido à alta composição em ácidos graxos saturados (>47%, C16:0, C18:0) do biodiesel de óleo de palma, seria necessário misturá-lo com aditivos ou outro biodiesel (por exemplo, de óleo de soja) para diminuir o ponto de fluxo a frio ou turbidez (temperatura do combustível no qual torna-se turvo devido a solidificação) para fazê-lo adequado para uso em países de clima frio (AKOH et al., 2007).

TABELA 1 – COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO DE PALMA, BIODIESEL E DIESEL.

	Óleo de palma	Biodiesel de palma	Biodiesel de soja	Diesel
Densidade, g mL ⁻¹	0,92	0,88	0,88	0,85
Viscosidade cinemática, mm ² s ⁻¹	39,6	4,4	4,1	4,3
Número de cetano	42	62 - 70	52	46 - 51
Ponto de fluxo a frio, °C	31	13 - 16	1	-5
Ponto de obstrução do filtro a frio, °C	--	12	--	-6

FONTE: Adaptado de (Fukuda et al., 2001; Benjumea; Agudelo, 2008; Leung et al., 2010; Singh; Singh, 2010)

2.2 LIPASES

2.2.1 Definição e reações de lipases

As lipases ou triacilglicerol hidrolases (E.C. 3.1.1.3) são definidas classicamente de acordo com a sua função natural em meio aquoso como carboxilesterases que catalisam a hidrólise de ligações éster de triacilglicerídeos (TAG) de cadeia longa (VERGER, 1997), atuando na interface lipídio-água, produzindo ácido graxo e glicerol (FIGURA 2A).

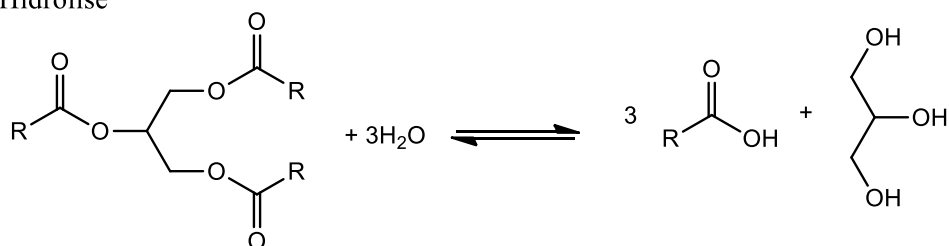
Lipases são comumente encontradas na natureza e obtidas a partir de fontes animais (estômago, tecido adiposo, vascular e linfático, lisossomos), vegetais (oleaginosas) e microbianas (bactérias e fungos), nas quais exercem um papel chave na modificação biológica de lipídios. Por outro lado, as lipases também conseguem catalisar reações além da sua catálise natural, ou seja, têm a capacidade de catalisar reações de síntese em meios aquo-restritos ou orgânicos, como as reações de esterificação, transesterificação (alcoólise, acidólise e aminólise) e interesterificação (FIGURA 2B). Isto confere às lipases um grande potencial de síntese orgânica e biotecnológico, como por exemplo, seu uso como aditivos ou ingredientes na indústria alimentícia, na remoção de ceras e triacilglicerídeos da madeira na indústria do papel, na produção de intermediários químicos, na produção de biodiesel, de surfactantes e na resolução de misturas racêmicas na indústria farmacêutica (JAEGER; REETZ, 1998; SAXENA et al., 1999).

As lipases têm determinadas especificidades, que estão relacionadas com as propriedades moleculares da enzima, com a estrutura do substrato e com fatores que afetam a ligação enzima-substrato. A especificidade de uma lipase pode ser classificada em relação à: (a) regioseletividade - propriedade relativa à hidrólise de ligações ésteres de acordo com a posição na molécula, podendo ser *sn*-1,3- ou *sn*-1,2-específicas, ou aleatoriamente em qualquer ligação; neste caso, são não-específicas (ver seção 2.3.1); (b) quimioseletividade – propriedade relativa à preferência por ácidos graxos com comprimentos de cadeia e graus de insaturação específicos; (c) estereosseletividade – que se refere à discriminação entre enantiômeros em misturas racêmicas. As lipases podem também apresentar a combinação de mais de um tipo de especificidade (KAPOOR; GUPTA, 2012). Dentro do primeiro grupo, a hidrólise por

lipases não-específicas leva ao rompimento de triacilglicerídeos até glicerol e ácidos graxos livres, com diacilglicerídeos e monoacilglicerídeos como intermediários da reação, mas esses intermediários não são acumulados, porque sua hidrólise é mais rápida que a dos triacilglicerídeos. As *sn*-1,3-específicas hidrolisam triacilglicerídeos até ácidos graxos, 1,2-diacilglicerídeos e 2-monoacilglicerídeos (SAXENA et al., 1999).

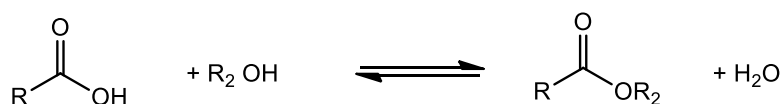
(A)

Hidrólise

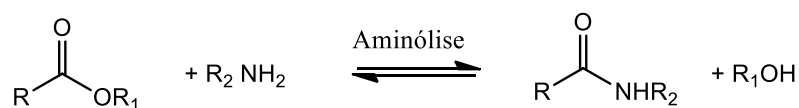
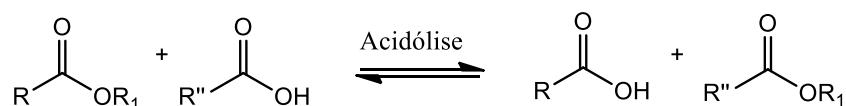
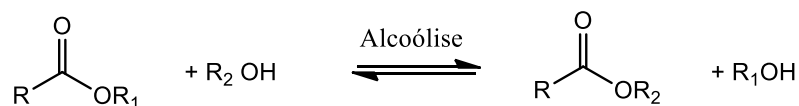


(B)

Esterificação



Transesterificação



Interesterificação

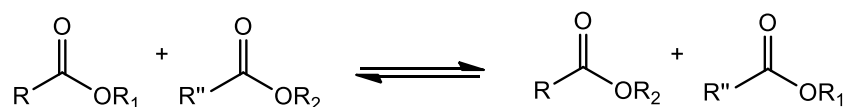


FIGURA 2 – (A) REAÇÃO NATURAL DE HIDRÓLISE E (B) REAÇÕES DE SÍNTESE EM CONDIÇÕES AQUO-RESTRITAS CATALISADAS POR LIPASES.

R, R'': cadeia longa de ácido graxo; R₁, R₂: cadeia alquílica curta.

FONTE: Adaptado de Saxena (1999)

2.2.2 Estrutura das lipases

As lipases pertencem a um grupo especial de esterases classificadas como serina-hidrolases, que são constituídas por uma tríade catalítica, composta normalmente pelos resíduos de aminoácidos serina, aspartato (ou glutamato) e histidina. O dobramento das lipases é do tipo α/β hidrolase (FIGURA 3), sendo compostas por uma folha β central, consistindo até oito diferentes fitas β anti-paralelas, conectadas por mais seis α -hélices (OLLIS et al., 1992; SCHRAG et al., 1997; JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER et al., 1999; BORNSCHEUER, 2002).

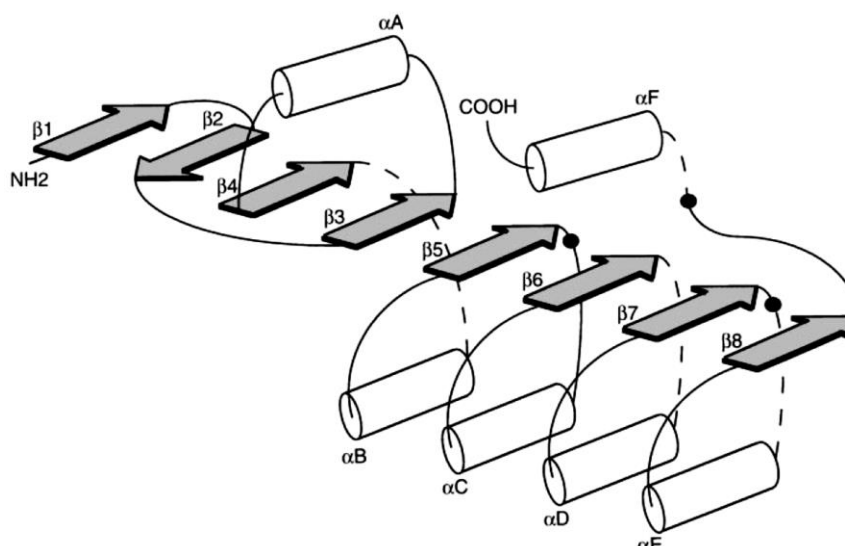


FIGURA 3 – MODELO ESTRUTURAL DO DOBRAMENTO α/β HIDROLASE.

As folhas β são representadas pelas setas (1-8) e as α -hélices pelos bastões vermelhos (A-F). Os resíduos His-Ser-Asp que formam a tríade catalítica estão representados pelas esferas pretas.

FONTE: de (OLLIS et al. (1992) referenciado por JAEGER et al. (1999)

Na maioria das lipases, o sítio ativo é coberto por uma “tampa” (*lid*) de estrutura α -hélice principalmente hidrofóbica, que dá lugar ao fenômeno conhecido como “ativação interfacial”, que consiste na mudança na estrutura tridimensional da lipase em presença de interfaces água/óleo, que “abre” a tampa, deixando a enzima ativa (SCHRAG et al., 1997; VERGER, 1997). No entanto, a presença da *lid* e o fenômeno da ativação interfacial, ao contrário do que se considerava há alguns anos, não são critérios adequados nem determinantes para classificar uma enzima como lipase, já que há lipases que possuem a *lid* em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (JAEGER; REETZ, 1998), e outras que não a possuem, mas exercem

atividade hidrolítica sem ativação interfacial (SCHRAG et al., 1997). Assim, o critério utilizado para classificar lipases, e o mais aceito atualmente, é a diferença de especificidade preferencial pelo substrato entre uma lipase e uma esterase, sendo para as lipases os triacilglicerídeos constituídos de ácidos graxos de cadeia longa (mais de 8 carbonos, tendo a trioleína como substrato padrão) e para as esterases, os ésteres de baixa massa molar. Deve-se enfatizar que a maioria das lipases podem hidrolisar os substratos de esterases, enquanto que o inverso não é verdadeiro (VERGER, 1997; JAEGER; REETZ, 1998).

2.2.3 Produção de lipases por fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido (FES) é um método que vem sendo relatado para a produção e imobilização de lipases e células inteiras (CORDOVA et al., 1998; RODRIGUEZ et al., 2006; CHRISTOPHER et al., 2014). No processo de FES, o micro-organismo cresce em substratos sólidos porosos umedecidos ou suportes inertes, com quantidades mínimas de água livre e uma fase contínua gasosa entre os espaços das partículas, facilitando o processo de transferência de oxigênio. O micro-organismo pode crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da matriz do substrato) ou sobre a superfície do substrato, consumindo o substrato e excretando enzimas e metabólitos, que também ficam naturalmente adsorvidos por interações físicas, tais como ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas (PANDEY, 2003; MITCHELL et al., 2006; TRAN; BALKUS, 2011). Em FES, geralmente um polímero sintético (como espuma de poliuretano) ou de resíduos agroindustriais (como bagaço de cana) constitui a estrutura sólida ou suporte, que pode ou não ser degradado pelo micro-organismo durante a fermentação (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). A utilização de resíduos na FES permite uma redução significativa dos custos da produção das lipases, já que são provenientes da extração de óleo de sementes (tortas ou farelos) ou de bagaços provenientes da indústria de processamento do amido, da cana de açúcar ou de cítricos (CORDOVA et al., 1998; PANDEY, 2003).

Apesar das vantagens da produção de enzimas por FES, alguns fatores, como a falta de homogeneidade do meio e a dificuldade de medida e controle dos parâmetros de aeração, pH, temperatura e umidade, dificultam a produção de compostos de

interesse em grande escala (COUTO; SANROMÁN, 2006). Além disso, durante a FES é gerada uma grande quantidade de calor metabólico, que pode afetar o crescimento do micro-organismo por restrições na transferência de calor (PANDEY, 2003; MITCHELL et al., 2006), o que faz a produção industrial de enzimas por FES ainda um grande foco de estudo.

Uma técnica paralela à FES é a imobilização usando partículas de suporte de biomassa (PSB), a qual imobiliza as lipases e células inteiras também por adsorção superficial (BAN et al., 2001; HAMA et al., 2006; TALUKDER et al., 2013). No entanto, esta técnica implica primeiro a produção de células e lipases por fermentação submersa (FSm), o emprego de suportes sintéticos não-degradáveis e perda de parte das lipases durante as etapas de imobilização do biocatalisador.

2.2.4 Lipases de *Burkholderia contaminans* e de *Rhizopus microsporus*

Há duas principais categorias de lipases produzidas durante crescimento microbiano: lipases extracelulares, que são excretadas pelo micro-organismo ao meio de crescimento, e lipases intracelulares, que permanecem nas paredes celulares ou no interior da célula (GOG et al., 2012; LOURINHO; BRITO, 2015). As razões para o enorme potencial biotecnológico de lipases microbianas incluem os fatos de que elas são estáveis em solventes orgânicos, não necessitam de cofatores, possuem uma grande especificidade ao substrato e exibem uma alta estereosseletividade (JAEGER; REETZ, 1998).

Burkholderia contaminans é um dos integrantes do complexo *Burkholderia cepacia*, que compreende um grupo de organismos intimamente relacionados que são muito versáteis, podendo ser utilizados para fins de controle biológico, biorremediação e promoção de crescimento de plantas. Entretanto, algumas espécies podem ser oportunistas e causar infecções humanas, em particular em pacientes com fibrose cística, o que pode dificultar a sua utilização nestas aplicações biotecnológicas (VANLAERE et al., 2009). As lipases produzidas pelo gênero *Burkholderia* são conhecidas por serem não-específicas (MATORI et al., 1991; STADLER et al., 1995). A cepa *B. contaminans* LTEB11 utilizada neste trabalho é uma bactéria gram-negativa, anteriormente identificada como *Bacillus megaterium* (LIMA et al., 2004) e como *Burkholderia cepacia* (FERNANDES et al., 2007). A bactéria produz, em fermentação

submersa, uma lipase com massa molecular de aproximadamente 34 kDa. Em estudos de estabilidade, a esta lipase manteve 100% da atividade inicial após incubação por 1 h em solventes hidrofílicos e hidrofóbicos (isopropanol, butanol, tolueno, *n*-hexano e *n*-heptano). A temperatura para sua máxima atividade lipolítica foi de 55 °C, com atuação ótima na faixa de pH entre 6 a 8 (LIMA et al., 2004). Os sólidos fermentados de *B. cepacia* produzidos com bagaço de cana e farelo de girassol apresentaram uma atividade de hidrólise média contra a trioleína de 118 U g⁻¹ SS (unidade de atividade por grama de sólido fermentado seco) e 5,9 U g⁻¹ SS de atividade de esterificação, determinada pela síntese do oleato de etila (SOARES et al., 2013; DIAS, 2015). Estes sólidos fermentados mostraram-se bastante estáveis, mantendo 72% e 85% de sua atividade quando incubados com em etanol e em *n*-hexano, respectivamente, por 48 h (SOARES et al., 2013).

Rhizopus é um gênero importante de fungos filamentosos que tem sua aplicação no processo fermentativo de produção de alguns alimentos, na degradação de solos e material vegetal e na produção industrial de enzimas. *Rhizopus microsporus* é um grupo complexo difícil de diferenciar morfológicamente, que se caracteriza pela presença de hifas e formação de micélio (JENNESSEN et al., 2008), e por produzir lipases *sn*-1,3-específicas (OKUMURA et al., 1976; MATORI et al., 1991). A cepa *R. microsporus* CPQBA 312-07 DRM utilizada neste trabalho foi isolada no México e cedida pelo Professor Jesus Cordova (Universidade de Guadalajara, México), e tem sido utilizada para a produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES). O sólido fermentado produzido por este fungo, utilizando bagaço de cana, solução de nutrientes e óleo de soja, apresentou uma máxima atividade de hidrólise frente à trioleína de 170 U g⁻¹SS, com temperatura ótima para a atividade de 55 °C. A atividade de esterificação do sólido fermentado foi 19 U g⁻¹SS, utilizando-se a reação de síntese do oleato de etila, a 45 °C. O sólido fermentado manteve sua atividade estabilidade quando incubado em *tert*-butanol, *n*-hexano e *n*-heptano respectivamente por 24 h, com atividades residuais de 80, 95 e 100%, respectivamente. Também mostrou estabilidade à temperatura, mantendo até 90% da atividade inicial em temperaturas de até 60 °C, por 24 h (BOTTON, 2014).

Hama et al. (2006) e Sun; Xu, (2009) relataram para *Rhizopus oryzae* e para *Rhizopus chinensis* a produção de lipases com diferença nas atividades de hidrólise e

de esterificação (metanólise), identificando às lipases intracelulares e ligadas à membrana como as responsáveis pela atividade de síntese e as lipases extracelulares, pela atividade de hidrólise.

2.3 PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR LIPASES

2.3.1 Modelos da reação de alcóólise catalisada por lipases

Existe uma dependência dos modelos de reação de transesterificação com o ambiente aquoso. Considerando um sistema macroaquoso, no qual a água forma uma monocamada nas imediações do sítio ativo, foi proposto um modelo de reação de transesterificação mediante etapas sucessivas: os triacilglicerídeos (TAG) são primeiramente hidrolisados pela lipase até acilglicerídeos parciais (diacilglicerídeos, DAG, e monoacilglicerídeos, MAG) e ácidos graxos livres (AGL), seguindo-se a esterificação dos AGL pelo metanol, formando ésteres metílicos (EMe) (KAIEDA et al., 1999). A velocidade de hidrólise é maior que a de esterificação, fazendo com que AGL sejam observados como produtos intermediários na reação (FIGURA 4).

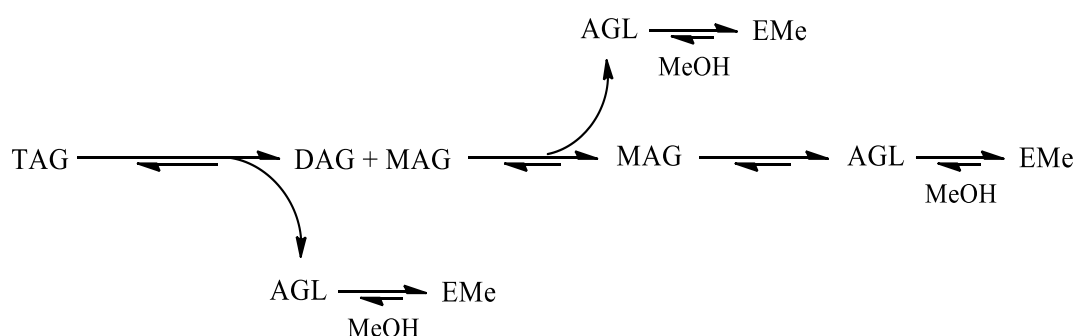


FIGURA 4 – ESQUEMA DE METANÓLISE COM LIPASE EM SISTEMA MACROAQUOSO.

FONTE: Adaptado de Kaieda et al. (1999)

Com relação ao mecanismo enzimático, há diferentes modelos, do tipo *Bi Bi* ordenado, *Ping Pong Bi Bi*, *Uni-Bi* ordenado ou aleatório, todos baseados na formação de complexos enzima-substrato e diferentes etapas determinantes da velocidade (MALCATA et al., 1992). No entanto, o modelo *Ping Pong Bi Bi* tem sido o que melhor

se correlaciona aos dados experimentais (MALCATA et al., 1992; PAIVA et al., 2000; AL-ZUHAIR et al., 2007; LI et al., 2010).

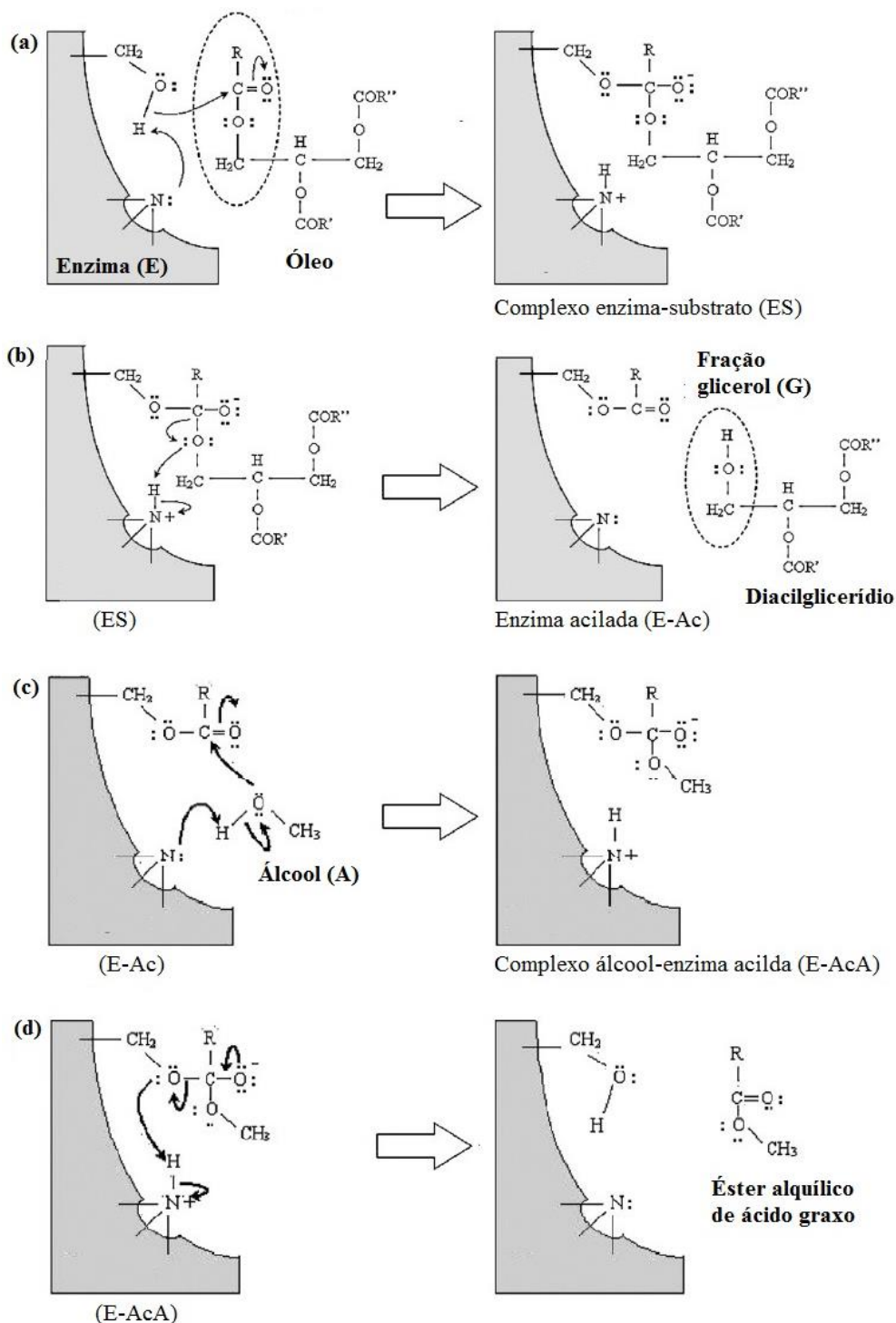


FIGURA 5 – PROPOSTA DE MECANISMO TIPO *PING PONG BI/BI* PARA A ALCOÓLISE DE TRIACILGLICERÍDEOS EM SISTEMA MICROAQUOSO EM MEIO ORGÂNICO.

FONTE: adaptado de Al-Zuhair (2007)

De forma similar ao mecanismo de hidrólise proposto por Jaeger et al. (1994), foi proposto por Al-Zuhair et al. (2007) um mecanismo para a transesterificação com base no modelo *Ping Pong Bi Bi*, mas considerando um sistema microaquoso, no qual uma pseudo-monocamada com poucas moléculas de água está presente em torno da enzima. É assumido que o processo ocorre por alcoólise direta dos TAG, com quatro sucessivas etapas (FIGURA 5): na etapa (a) um ataque nucleofílico da hidroxila do resíduo da serina a uma carbonila (ativada) de uma ligação glicerol éster do TAG leva à formação do complexo enzima-substrato; na etapa (b) é quebrada uma ligação éster do TAG é liberado DAG, deixando a lipase acilada; na etapa (c) o álcool após de um ataque nucleofílico forma o complexo com a enzima acilada e, finalmente, na etapa (d) é liberado o éster alquílico de ácido graxo (biodiesel) e são recuperados os grupos funcionais do sitio catalítico da lipase. Os dados experimentais da metanólise de óleo de palma com lipases livres de *Mucor miehei* em sistema microaquoso em *n*-hexano foram bem correlacionados com o modelo cinético matemático e, portanto, com o mecanismo de reação proposto. O modelo considera tanto a inibição competitiva do álcool, como a inibição também competitiva pelo substrato, já que altas concentrações de substrato levam também à formação de complexos com a enzima acilada (AL-ZUHAIR et al., 2007). É importante realçar que, se o meio reacional é macroaquoso, o mecanismo enzimático a partir da lipase acilada pode resultar em uma competição entre nucleófilos (água e álcool), gerando ácidos graxos intermediários por hidrólise, que poderiam ser imediatamente esterificados pela lipase (ver FIGURA 4).

Por outro lado, considerando o tipo de regioseletividade das lipases (seção 2.2.1), a reação de transesterificação leva à produção de ésteres e de glicerol com lipases não-específicas ou de monoacilglicerídeos com lipases *sn*-1,3-específicas (FIGURA 6A e 6B) (KAPOOR; GUPTA, 2012). Quando as lipases são *sn*-1,3-específicas, mais um importante fenômeno deve ser considerado nas cinéticas do processo global das reações de alcoólise: a cinética da migração do grupo acila (LI et al., 2010; TRAN et al., 2013). Durante a migração do grupo acila da posição *sn*-2 para a posição *sn*-1 ou *sn*-3, um 2-MAG ou um 1,2(2,3)-DAG é transformado em 1-MAG e 1,3-DAG, respectivamente. Este processo químico ocorre espontaneamente quando o meio reacional está em um sistema macroaquoso, com ou sem a presença da lipase e é uma das razões para obter-se conversões em éster maiores ao valor teórico esperado para lipases *sn*-1,3-específicas (66,66%) (KAIEDA et al., 1999; LI et al., 2010), já que

os produtos da migração acílica (1,3-DAG e 1-MAG) podem ser posteriormente transesterificados mais rápido pela lipase (FIGURA 6C).

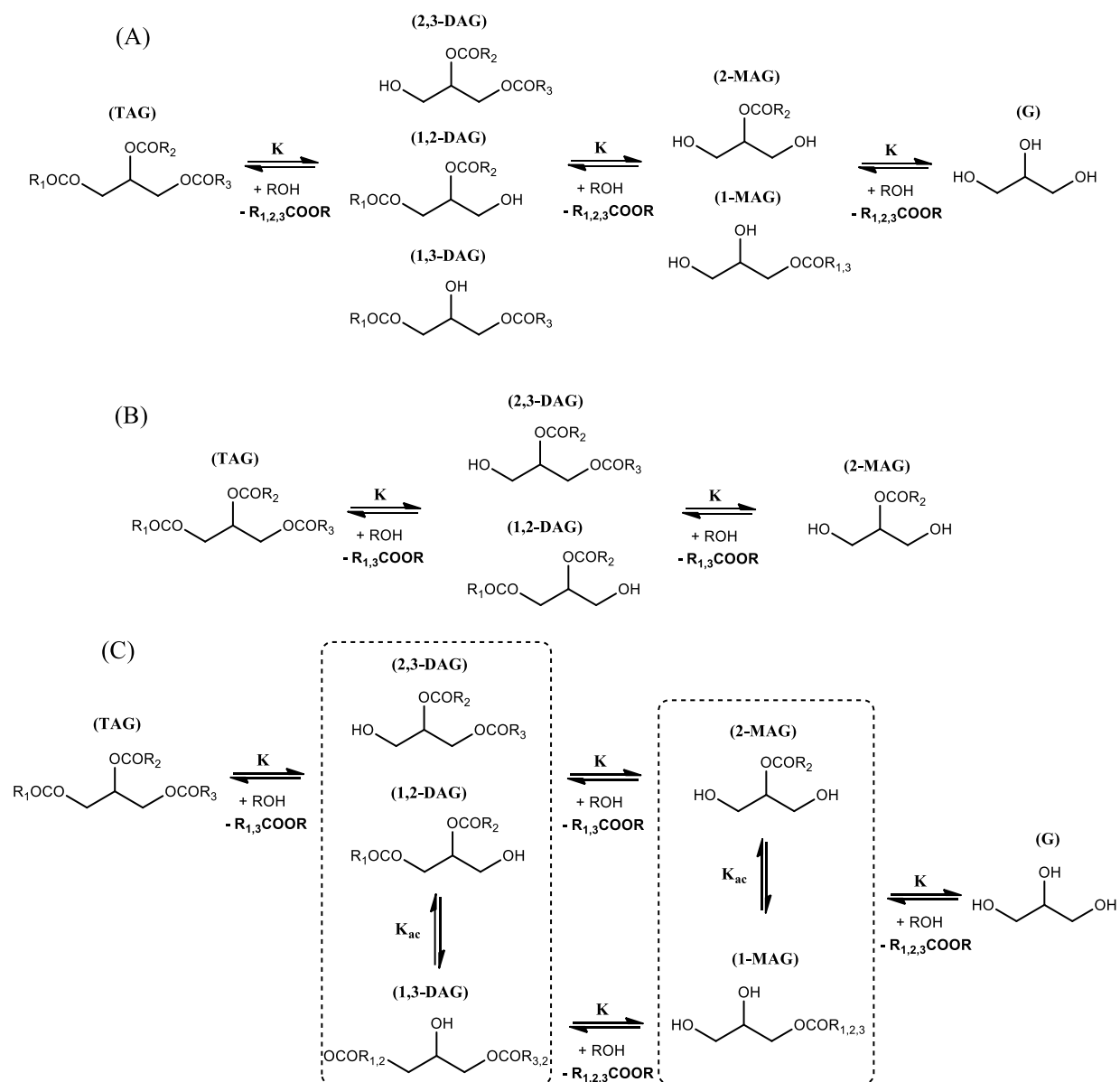


FIGURA 6 – ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASES (A) NÃO-ESPECÍFICAS, (B) *sn*-1,3-ESPECÍFICAS E (C) *sn*-1,3-ESPECÍFICAS COM MIGRAÇÕES QUÍMICAS DO GRUPO ACILA *sn*-2.

R_{1,2,3}: cadeia longa de ácido graxo; R: cadeia alquílica curta. TAG: triacilglicerídeo, DAG: diacilglicerídeo, MAG: monoacilglicerídeo, G: glicerol.

FONTE: adaptado de Li et al. (2010) e Kapoor, Gupta (2012)

2.3.2 Reatores

Para a produção enzimática do biodiesel, há dois tipos de reatores utilizados: o reator de tanque agitado (*stirred tank reactor*, STR) e o reator de coluna de leito empacotado (*packed-bed reactor*, PBR), e que podem ser operados geralmente de dois modos: contínuo, com o fornecimento do meio reacional e a retirada do produto continuamente, e descontínuo (batelada), com o fornecimento total ou gradual dos substratos desde o início da reação, mas que permanece constante por um determinado tempo no reator. O sistema STR em modo de batelada em tanques ou frascos agitados (FA) é o típico usado no laboratório, devido à configuração simples. Porém, tem principalmente dois aspectos negativos: (1) a desnaturação das enzimas e a quebra do suporte, causados pela tensão de cisalhamento durante a agitação, limitando o seu re-uso por longos períodos de tempo (TAN et al., 2010); (2) em grande escala seriam necessários grandes volumes do tanque e longos tempos de reação, o que pode implicar baixas produtividades (NIELSEN et al., 2008).

Em um sistema PBR, a relação de enzima/substrato será elevada em qualquer momento específico, no entanto a operação em modo de batelada (circulação em ciclo fechado) com enzimas imobilizadas (FIGURA 7) permite maiores tempos de contato entre os substratos líquidos e o catalisador sólido quando comparado com o modo contínuo, que tem só uma única passagem da mistura reacional através do leito (NIELSEN et al., 2008).

Este sistema pode ser operado também em desenhos de várias colunas em série, de forma contínua ou descontínua, permitindo o emprego de enzimas de diferentes graus de atividade, o qual implica que a enzima pode ser utilizada mais eficazmente até que a atividade se torne muito baixa (FJERBAEK et al., 2009). No entanto, o declínio gradual da atividade enzimática, enquanto aumenta o número de re-usos, também faz com que o tempo de reação deva ser aumentado em conformidade, para manter o grau de conversão constante (NIELSEN et al., 2008). Com sistemas PBR, tanto em escala piloto como industrial, o fluxo ascendente do substrato é geralmente preferível ao fluxo descendente porque reduz a compressão do leito que resulta em entupimentos com pobre transferência de oxigênio e quedas de pressão (CHRISTOPHER et al., 2014).

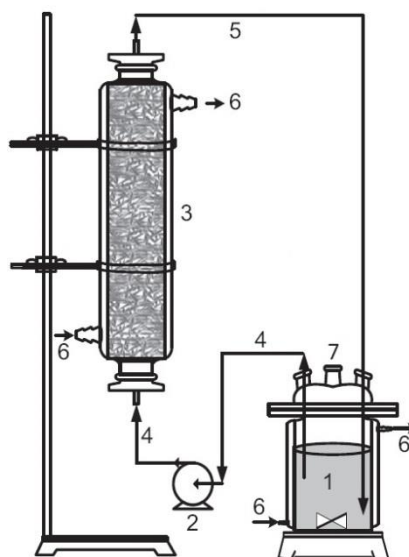


FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA DE REATOR EM COLUNA DE LEITO EMPACOTADO EM MODO DESCONTÍNUO USADO PARA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO.

(1) Reservatório; (2) bomba peristáltica; (3) reator de leito empacotado contendo enzima imobilizada; (4) alimentação da mistura de reação ao reator; (5) saída da mistura de reação do reator; (6) jaqueta de água; (7) orifício da amostragem. As setas indicam a direção na qual o meio é recirculado através do sistema.

FONTE: Adaptado de Soares et al. (2015)

2.3.3 Utilização de sólidos fermentados contendo lipases como catalisadores

Estudos prévios mostraram que é possível produzir biodiesel por catálise enzimática usando sólidos fermentados (SF) em reações de transesterificação e de esterificação. Além das lipases extracelulares naturalmente imobilizadas, os SF contêm células inteiras dos micro-organismos utilizados na fermentação. A principal vantagem de utilização de sólidos fermentados relaciona-se com o fato de estes, depois de secos, poderem ser utilizados diretamente como biocatalisadores sem a necessidade, como no caso da fermentação submersa, de extração, purificação e imobilização das lipases, o que se traduz em menores custos de produção enzimática de biodiesel (FERNANDES et al., 2007; SALUM et al., 2010; LIU et al., 2013; SOARES et al., 2013; AGUIEIRAS et al., 2014; ZAGO et al., 2014).

No grupo de Tecnologia Enzimática e Biocatálise da UFPR foram produzidos sólidos fermentados por cultivos com *Burkholderia cepacia* LTEB11 (atualmente *B.*

contaminans), utilizando como substrato sólido uma mistura 1:1 (em massa) do bagaço de cana e farelo de semente de girassol. O sólido fermentado foi utilizado em um PBR em sistema livre de solventes para a etanólise do óleo de soja, obtendo-se 92% de conversão em 46 h (SALUM et al., 2010). Soares et al. (2013) utilizaram o mesmo sólido fermentado na esterificação de ácidos graxos obtidos a partir de óleo de borra ácida de soja, com conversões de 92% em 31 h. Por outro lado, Zago et al. (2014) produziram sólidos fermentados com *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM por FES com bagaço de cana impregnado com uma emulsão contendo óleo de soja e meio de cultivo. A etanólise de óleo de milho com este sólido fermentado em PBR atingiu uma conversão de 68% em 72 h.

Por outro lado, Aguiéiras et al. (2014) produziram sólido fermentado do fungo *Rhizomucor miehei* sobre torta de babaçu e aplicaram-no na esterificação de AGL obtidos da hidrólise do óleo de macaúba, na razão molar de 2:1 (etanol:AGL) em sistema livre de solvente, e relataram 91% de conversão em 8 h da reação. Ainda neste trabalho, foi feita uma comparação entre o SF e as lipases comerciais imobilizadas Novozym 435 e Lipozyme RM IM. A cinética de produção dos ésteres catalisada pelo sólido fermentado foi semelhante àquela das lipases comerciais imobilizadas.

Porém, entre os sólidos fermentados testados em reações livres de solvente (TABELA 2) existem dificuldades operacionais: a) o aumento da viscosidade do meio reacional durante etanólise, devido à acumulação do glicerol no meio que, em PBR causa entupimento do leito e se deposita sobre o sólido fermentado, causando problemas de transferência de massa; b) a adsorção de 30% do meio reacional no sólido durante a etapa de esterificação, que leva a uma alteração do microambiente da lipase, o qual termina com composições diferentes do meio reacional circulante, com alto teor de etanol adsorvido no sólido fermentado, causando inativação da lipase. Mesmo que as características do SF sejam bem complexas devido à presença de células, outros metabólitos e restos de meio de cultura, a fase sorvida nele é predominantemente polar, sendo majoritariamente água e etanol, mas com significantes quantidades de éster e quantidades menores de ácido graxo (SOARES et al., 2015).

TABELA 2 – ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍlicos POR TRANSESTERIFICAÇÃO E POR ESTERIFICAÇÃO EM SISTEMAS LIVRES DE SOLVENTE UTILIZANDO SÓLIDOS FERMENTADOS CONTENDO LIPASES DE *Rhizopus microsporus* E DE *Burkholderia contaminans*.

	Suporte	Ácido / Óleo	Razão molar Etanol: Lipídio	Reator / Temperatura	Conversão /Tempo /Temperatura	Produtividade (mg g ⁻¹ SS h ⁻¹)*	Reuso / Conversão / Tempo	Referência
<i>R. microsporus</i>	SF (BC+OS)	Ácido oleico	10:1	FA, 40 °C	98% / 48 h	118	3 / 60% / 144 h	(BOTTON, 2014)
		AGBS	10:1	PBR, 40 °C	58% / 48 h	60	nd	
		Óleo de milho	3:1	PBR, 44 °C	68% / 72 h	64	nd	ZAGO et al. (2014)
	SF (BC+FSG)	Ácido oleico	3:1	FA, 44 °C	15% / 4 h	nd	nd	(ZAGO, 2010)
		Óleo de milho			50% / 72 h			
<i>B. contaminans</i>	SF (BC+FSG)	Oleína animal	1,5:1	PBR em série, 45 °C	88% / 24 h	336	5 / 58% / 240 h	(DIAS, 2015)
		Ácido oleico	3:1	PBR, 50 °C	82% / 88 h	nd	nd	SOARES et al. (2013)
		AGBS	3:1		92% / 31 h	272	5 / 84% / 240 h	
		Óleo de soja	3:1	PBR, 50 °C	95% / 46 h	152	3 / 95% / 141 h	SALUM et al. (2010)

SF: sólido fermentado; BC+OS: bagaço de cana com solução umedecedora e óleo de soja; (BC+FSG): mistura de bagaço de cana e farinha de semente de girassol; AGBS: ácidos graxos da borra de soja; FA: frascos agitados; PBR: *packed-bed reactor*; nd: não determinado. * mg g⁻¹SS h⁻¹: quantidade de éster produzido por massa de sólido fermentado seco por hora.

Para que o desenvolvimento de um processo de produção do biodiesel catalisado por sólidos fermentados contendo lipases seja viável para escalonamento, é necessário otimizar as condições para obter as máximas conversões com maiores velocidades de reação e aumentar assim a produtividade do processo. Além disso, é necessária a estabilidade das lipases nas condições de reação e nos meios reacionais, para propiciar, assim, uma maior reutilização do biocatalisador em sucessivos ciclos de reação.

2.3.4 Os problemas da reação de alcoólise catalisada por lipases e as estratégias básicas para resolvê-los

O principal problema associado às reações de alcoólise catalisadas por lipases é a diminuição dos rendimentos da reação causada pela inibição competitiva e pela desnaturação da enzima pelo álcool. Parte da camada de hidratação necessária para manter a enzima na sua conformação estrutural nativa pode ser removida pelo excesso de álcool, levando, conseqüentemente, à desnaturação irreversível da enzima (SHIMADA et al., 1999; AL-ZUHAIR et al., 2007; FJERBAEK et al., 2009). O efeito desestabilizador de álcoois nas lipases parece diminuir com o aumento da massa molecular do álcool (NIELSEN et al., 2008). Por exemplo, moléculas de metanol conseguem chegar a conformações mais internas da lipase e desidratá-la muito mais do que as moléculas de etanol. Este problema de inativação de lipases por álcoois foi estudado e inicialmente resolvido por Shimada et al. (1999), que relataram que a adição de metanol por etapas diminui a inativação da lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435). Desta forma, foi atingido, em um STR, até 90% de rendimento em ésteres metílicos a partir de óleos vegetais, e uma reutilização de até 50 vezes, sem perda significativa de atividade.

Álcoois de cadeia curta, especialmente metanol, têm baixa solubilidade em óleos, o que ocasiona o aparecimento de uma nova fase líquida no sistema. Solventes orgânicos no meio reacional têm sido utilizados para melhorar a homogeneidade na mistura reacional, reduzir a viscosidade do meio, aumentar a taxa de difusão dos substratos e reduzir os problemas de transferência de massa em torno da enzima. Por outro lado, os solventes também são usados como estratégia para diminuir os efeitos deletérios do álcool sobre a atividade de lipases. Por exemplo, a utilização de solventes

não-polares em lipases imobilizadas mantém a água residual em torno da enzima, aumentando a atividade da água no microambiente e ajudando a manter a estabilidade das lipases (FJERBAEK et al., 2009). No entanto, os sistemas livres de solvente são mais indicados em processos industriais, e devem ser um objetivo para o futuro na síntese enzimática do biodiesel, pois têm a vantagem de funcionar com altas concentrações de substrato, o que aumenta a produtividade volumétrica e, conseqüentemente, reduz o custo do processo, além de evitar a necessidade de remover o solvente do produto final. Infelizmente, a produção de biodiesel enzimática sem solvente é caracterizada pela menor velocidade de reação do que quando são utilizados solventes, e por isso ainda se necessitam mais estudos para o processo ser viável (QIN et al., 2008)

A imobilização de uma lipase em um suporte sólido tem sido uma estratégia apropriada para aumentar a estabilidade da enzima frente aos solventes, à temperatura, ao meio reacional e à desnaturação por cisalhamento em sistemas agitados, bem como, para facilitar a manipulação e recuperação da enzima. Porém, durante reações de transesterificação com lipases imobilizadas, surgem principalmente dois problemas: a) limitação de transporte de massa interno, já que moléculas grandes, como TAG e ésteres de ácido graxo têm que se difundir através de pequenos poros para alcançar as moléculas de enzima e para sair à fase externa, enquanto que reagentes apenas moderadamente solúveis no meio reacional (álcoois) tem que percorrer esses canais preenchidos com óleo e produtos da reação (FJERBAEK et al., 2009); e b) acumulação de produtos de reação, particularmente do glicerol, quando a enzima é imobilizada em suportes hidrofílicos (AKOH et al., 2007). Marty et al. (1997) e Dossat et al. (1999) reportaram perda de atividade pela formação de um filme ou camada externa de glicerol sobre a interface das lipases. Os autores sugeriram que isto seria devido, por um lado à uma redução da pressão interfacial, que por sua vez, eleva a energia superficial e tem efeitos desnaturantes na enzima, e, por outro lado, a uma modificação da atividade da água ótima (a_w de 0,54) da lipase. Além disso, o glicerol poderia ser um obstáculo hidrofílico que limitaria ainda mais a difusão dos substratos hidrofóbicos da fase orgânica até a enzima imobilizada.

Não obstante, em reatores de STR ou PBR os efeitos da adsorção do glicerol sobre a enzima imobilizada podem ser compensados por incrementos da agitação ou do fluxo respectivamente ou pela introdução de passos de separação para remover o

glicerol formado, permitindo seu assentamento no fundo do reator (WATANABE et al., 2000; NIELSEN et al., 2008). Stevenson et al. (1994) propuseram uma solução simples, adicionando sílica gel no meio reacional para adsorver o glicerol produzido durante a reação catalisada pela lipase comercial imobilizada de *Mucor meihei*. Os autores também testaram outros adsorventes como celulose, amido e carvão, mas sua eficiência foi menor do que a da sílica gel, que permitiu aumentar a conversão de 70% para 98%. Dossat et al. (1999) testaram várias alternativas para conservar a atividade enzimática: 1) também adicionaram sílica gel ao leito empacotado, mas não foram observadas melhoras significativas na estabilidade das lipases no reator; 2) aumentaram a solubilidade do glicerol no meio reacional mediante a mistura deste e *n*-hexano com acetona, mas também não foram recuperadas altas conversões; e 3) desenvolveram um processo semi-contínuo, com lavagens do leito empacotado entre ciclos de transesterificação com solução de butanol ou *tert*-pentanol (com atividade da água ajustada a 0,54 com solução saturada de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$). Neste último caso, o glicerol foi removido do reator e a conversão inicial foi restaurada.

Algumas outras estratégias para contornar os problemas da inativação de lipases pelo álcool e da adsorção do glicerol sobre a enzima imobilizada são as seguintes:

A) utilização de *tert*-butanol no meio reacional, já que este solubiliza tanto o álcool como o glicerol, e não serve de substrato para a lipase, pois esta dificilmente atua sobre álcoois terciários. Li et al. (2006) relataram uma conversão de 95% em 12 h utilizando combinadamente a lipases comerciais Lipozyme TL IM e Novozyme 435, na proporção de 3:1, com uma relação *tert*-butanol/óleo de colza 1/1 e uma razão molar metanol:óleo 4:1, a 35 °C. Posteriormente, Royon et al. (2007) utilizaram *tert*-butanol (32,5%, v v⁻¹) para a metanólise de óleo de semente de algodão, utilizando a lipase imobilizada Novozyme 435. Estes autores relataram uma elevada conversão (97%) após de 24 h a 55 °C em STR em modo batelada e de 95% em PBR em modo contínuo por até 500 h.

B) Mediante hidroesterificação, feita em duas etapas: inicialmente, fazendo a hidrólise do óleo e removendo o glicerol formado, e, posteriormente, fazendo a esterificação dos ácidos graxos do óleo obtidos na primeira etapa. Talukder et al. (2010) utilizaram o processo de hidroesterificação para o óleo de palma bruto com uma solução enzimática de *Candida rugosa* na presença de isso-octano, atingindo 100% de hidrólise em 4 h. Na segunda etapa, depois da separação dos ácidos graxos, utilizaram

a lipase Novozym 435, obtendo 98% de conversão em 2 h, em comparação com a metanólise do óleo de palma bruto que só rendeu 52% em 24 h.

C) Uso de diferentes receptores de acila, tais como acetato de metila ou etila e seus anidridos, em reações de interesterificação (ver FIGURA 2B, pag. 24). Xu et al. (2003) e Du et al. (2004) estudaram o uso de acetato de metila para a produção de biodiesel catalisada pela lipase Novozym 435 a partir de óleo de soja (refinado e bruto) em sistema livre de solvente, obtendo 92% de rendimento em 14 h. A razão molar acetato de metila/óleo foi de 12:1 e a temperatura da reação foi de 40 °C. A outra vantagem desta reação de interesterificação sobre a alcoólise é que não é formado o glicerol, o que permite uma maior estabilidade operacional da lipase (até 100 ciclos sem perda da atividade). O subproduto, neste caso, é o triacetilglicerol (triacetina), que tem maior valor comercial que o glicerol e poderia assim compensar o custo da produção enzimática de biodiesel feita a partir destes receptores de acila, mais caros que os álcoois. Em geral, o uso de receptores de acila de dois carbonos, como etanol ou acetato de etila, confere ao biodiesel um maior número de cetano, menores pontos de fluxo a frio e fluidez (que melhoram arranques a frio), maiores pontos de ignição e combustão, e menores opacidade de fumaça e temperaturas de escape (AKOH et al., 2007).

2.3.5 Combinação de lipases na síntese do biodiesel

Conhecida a limitação das lipases *sn*-1,3-específicas e sua dependência da migração do grupo acila da posição *sn*-2 para a posição *sn*-1 durante reações de transesterificação para obter altas conversões, foram propostas estratégias de produção de biodiesel empregando misturas de lipases imobilizadas de diferentes especificidades. Lipases *sn*-1,3-específicas e não-específicas podem reagir sinergicamente, de tal forma que lipases não-específicas complementam as deficiências de reação nas posições internas (*sn*-2) dos acilglicerídeos (FIGURA 8, pag. 41). Lee et al. (2006) conseguiram, na metanólise de óleo de soja com lipases *sn*-1,3-específicas de *R. oryzae* um 70% de conversão em 18 h, e com lipases não-específicas de *C. rugosa* obtiveram só 20% em 30 h. Quando a reação foi feita com a mistura das duas enzimas na proporção 1:1, a conversão aumentou para 99% em 21 h. Posteriormente, este tempo de reação foi reduzido para apenas 3 h, mediante a co-imobilização (imobilização conjunta de duas enzimas) das lipases sobre sílica gel (LEE

et al., 2013). Paralelamente, Jin et al. (2013) também evidenciaram a ocorrência de efeito sinérgico significativamente favorável na reação de transesterificação, utilizando combinadamente as lipases de *C. antarctica* (não-específicas) e *R. miehei* (*sn*-1,3-específicas) expressas e ancoradas separadamente em células inteiras de *Pichia pastoris*. Relataram 90% de conversão em ésteres metílicos em 12 h de reação, em meio de co-solvente (iso-octano e *tert*-butanol).

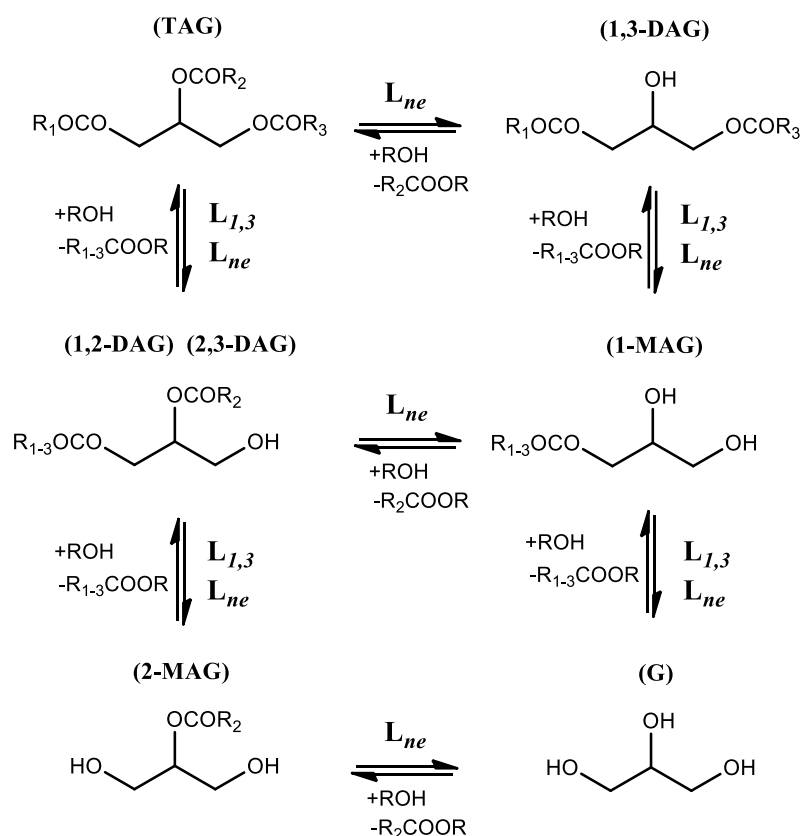


FIGURA 8 – ESQUEMA DO EFEITO SINÉRGICO DAS LIPASES *sn*-1,3-ESPECÍFICAS ($L_{1,3}$) E NÃO-ESPECÍFICAS (L_{ne}) NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO.

$R_{1,2,3}$: cadeia longa de ácido graxo; R: cadeia alquílica curta. TAG: triacilglicerídeo, DAG: diacilglicerídeo, MAG: monoacilglicerídeo, G: glicerol.

FONTE: O autor (2016)

Por outro lado, também foi relatada que a utilização de mistura de duas lipases *sn*-1,3-específicas, 80% de *Thermomyces lanuginosus* e 20% de *Rhizomucor miehei*, proporcionou um aumento de 15% e 55%, respectivamente, nas conversões de etanólise quando comparada com as conversões obtidas com cada lipase separadamente. O mecanismo de ação neste caso não é claro, mas uma possibilidade

para explicá-lo seria a existência de diferenças em outros tipos de especificidade das lipases, como a quimioseletividade (RODRIGUES; AYUB, 2011).

Tongboriboon et al. (2010) testaram uma estratégia alternativa para escolher misturas apropriadas entre cinco tipos de lipases, baseados nas diferenças de atividades de hidrólise, de esterificação e de transesterificação. Dessa forma, na síntese de biodiesel por etanolise de óleo de palma, acharam maior efeito sinérgico quando foram misturadas (1:1) duas lipases não-específicas (*Candida rugosa* e *Pseudomonas fluorescens*), que possuíam as maiores atividades de hidrólise e de transesterificação respectivamente. Com 2% de água no meio reacional, 10% de enzima em relação ao óleo e razão molar etanol:óleo 3:1, foi obtida em STR uma conversão de 91% em 6 h com adição de etanol em três etapas, em comparação com a conversão de 85% em 12 h, obtida quando foi utilizada somente a lipase de *P. fluorescens*. A mistura de lipases foi reutilizada em 15 ciclos, mantendo-se mais que 50% de atividade relativa. Os autores sugeriram a existência de um efeito protetor da inibição quando misturadas as lipases. Também foi relatado que o processo em PBR em modo contínuo com as lipases misturadas na coluna é mais eficiente do que com as lipases empacotadas separadamente na mesma coluna. Desta forma, em um processo com duas colunas em série com enzimas misturadas foi atingida uma conversão de 67% em 8 h a 45 °C.

2.3.6 Produção enzimática de biodiesel de óleo de palma

Alguns trabalhos representativos de produção de biodiesel mediante reações de transesterificação de óleo de palma (TABELA 3) são feitos na grande maioria, com lipases comerciais imobilizadas sobre suportes macroporosos, com metanol, em razões molares álcool:óleo acima de 4:1, em sistemas livres de solvente, com temperatura média de 40 °C, e reatores de tanque agitado (STR). As reações realizadas em STR em sistema livre de solvente atingem conversões desde 75 até 99%, mas algumas delas em tempos maiores que 35 h. Tempos menores que 18 h foram quando se utilizaram estratégias como as misturas de lipases, a adição de outro receptor de acila, como acetato de metila e o uso de reações assistidas por micro-ondas. Devido aos problemas operacionais associados à reação de transesterificação com enzimas imobilizadas (seção 2.3.4), os processos que puderam ser levados a sistemas PBR operados em modo contínuo foram com *tert*-butanol como solvente, atingindo uma

média de 83,3% de conversão estável por cima de 120 h. Com relação à reutilização dos biocatalisadores em reações de alcoólise em sistemas livre de solvente, com atividades residuais ou conversões relativas maiores a 70%, sem nenhum tratamento de lavagem, são obtidos até 4 ciclos e com lavagem, até 10 ciclos. Com a reação em presença de *tert*-butanol e sem lavagens, são obtidos também 10 ciclos de reutilização.

Neste contexto, o presente trabalho tem como enfoque: a) o uso de sólidos fermentados contendo lipases, como biocatalisadores de menor custo que as lipases comerciais; b) o uso de etanol como receptor de acila, em vista da sua menor toxicidade, menor custo e por ser renovável em comparação ao metanol; c) as reações em sistema livre de solvente, que facilitam a separação do diesel e reduzem custos operacionais e d) uma pré-otimização da reação de etanólise em frascos agitados e o posterior escalonamento do processo em reator de leito empacotado.

TABELA 3 – ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE ÓLEO DE PALMA UTILIZANDO LIPASES

Lipase	Suporte	Razão molar	Solvente	Reator / Temperatura	Conversão / Tempo	Ciclos de reuso / Lavagem	Referência
<i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	Células inteiras livres	Metanol / OP 6:1	Livre (10% água)	FA, 30 °C	83,3% / 72 h	2 (71% R) / não	(SRIMHAN et al., 2011)
<i>Aspergillus niger</i>	PSB por FSm +GA	Metanol / OP 3:1	Livre (15% água)	PBR, 40 °C	90% / 72 h	4 (94% R) / não	(XIAO et al., 2011)
<i>Aspergillus nomius</i>	PSB por Fsm	Metanol / OP 5:1	<i>tert</i> -butanol	FA, 40 °C	95,3% / 40 h	10 (88,2% A, 24 h cada) / não	(TALUKDER et al., 2013)
<i>Aspergillus oryzae</i> (recombinante)	PSB	Metanol / OP 4:1	Livre (5% água)	FA, 40 °C	99% / 96 h	nd	(ADACHI et al., 2013)
Lipase AK	POS-APV + GA	Etanol / OP 18:1	Livre	FA, 40 °C	98% / 72 h	5 (65% A, 24 h cada) / <i>n</i> -hexano	(MOREIRA et al., 2007)
Lipase PS					75% / 72 h	nd	
Lipase AY 50% e Lipase AK 50%	Accurel EP-100	Etanol / OP 3:1	Livre (2% água)	FA, 45 °C PBR, 45 °C	91% / 6 h 67% / 8 h	15 (50% A) / não nd	(TONGBORIBOON et al., 2010)
Novozym 435	Resina	Metanol / OP 3.2:1	Livre	FA, 60 °C	97% / 35 h	4 (82% R) / não	(TALUKDER et al., 2008)
Novozym 435	Resina	Metanol / AM / OP 1:12:1	Livre	FA, 50 °C	95% / 8 h	10 (90% A) / AM	(TALUKDER et al., 2011)
Lipase AK	POS-APV	Metanol / OP 8:1	Livre	FA, 43 °C (micro-ondas)	76,9% / 12 h	nd	(RÓS et al., 2013)
Lipozyme TL IM 53% e Lipozyme TL IM 47%	Resina	Metanol / OP 9:1	Livre	FA, 40 °C	80% / 18 h	7 (80% A) / <i>n</i> -hexano	(POPPE et al., 2015)
Lipase AK	POS-APV	Metanol / OP 9:1	Livre <i>tert</i> -butanol	PBR, 50 °C	61,6% / 96 h 87,6% / 24 h	240 h modo contínuo	(DORS et al., 2012)
Novozym 435	Resina	Metanol / OPR 4:1	<i>tert</i> -butanol	PBR, 40 °C	79% / 5h	120 h modo contínuo	(HALIM et al., 2009)
Lipozyme TL IM	Sílica gel	Metanol / OP	<i>tert</i> -butanol	FA, 40 °C	96% / 4 h	nd	(SIM et al., 2010)
<i>Candida rugosa</i> (1°) ^H	Livre	Tampão / OPB	Água	FA, 30 °C	100% / 4 h	10 (92% R) / não	(TALUKDER et al., 2010)
Novozym 435 (2°) ^E	Resina	Metanol / AGOP 1.2:1	Isooctano		98% / 2 h	50 (100% R) / <i>t</i> -butanol	

POS-APV: polisiloxano -álcool polivinílico. GA: glutaraldeído. PSB: partícula para suporte para biomassa. FSm: fermentação submersa. OP: óleo de palma. OPR: óleo de palma residual de cozinha. OPB: óleo de palma bruto. AGOP: ácidos graxos de óleo de palma. AM: acetato de metila. FA: frascos agitados. PBR: *packed-bed reactor*. R: Conversão relativa. A: Atividade residual. *nd*: não determinado. ^H Hidrólise. ^E Esterificação.

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A justificativa do trabalho se baseia em três principais premissas: 1) que o biodiesel é uma alternativa de combustível ambientalmente favorável, 2) que os sólidos fermentados são biocatalisadores de baixo custo, que podem levar a cabo reações de transesterificação em sistema livre de solvente, embora sejam necessários aumentos da conversão, da produtividade e da reutilização do sólido, e 3) que o óleo de palma é uma matéria-prima de grande interesse para a produção de biodiesel em nível mundial.

3.1 OBJETIVO GERAL

Aperfeiçoar e comparar a produção de biodiesel por etanólise do óleo de palma catalisada pelos sólidos fermentados produzidos por *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM e por *Burkholderia contaminans* LTEB11, mediante o estudo das cinéticas de reação em diferentes estratégias de reação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar as condições da produção de lipases por FES, empregando o mesmo substrato de cultivo para ambos os micro-organismos: bagaço de cana umedecido com solução nutriente e óleo de soja.
- Determinar as cinéticas de reação de etanólise do óleo de palma em frascos agitados com os sólidos fermentados produzidos por *B. contaminans* e por *R. microsporus*, otimizando a adição de etanol em etapas em determinadas razões molares etanol:óleo.
- Estudar a possibilidade de uma ação conjunta ou sinérgica entre misturas dos sólidos fermentados.

- Quantificar a produção e acumulação de glicerol nos sólidos fermentados para posteriormente avaliar duas opções de reação em duas etapas: uma opção removendo o glicerol retido no sólido e outra, trocando o sólido da primeira etapa por um novo.
- Extrapolar as condições de reação em frascos agitados para o reator de leito empacotado com sólido, operado em modo descontínuo.
- Avaliar a reutilização do sólido fermentado em sucessivos ciclos de etanólise após diferentes lavagens dos sólidos com *n*-hexano e/ou *tert*-butanol.

A Figura 9 apresenta a estratégia deste trabalho, onde estão enquadrados os objetivos anteriores.

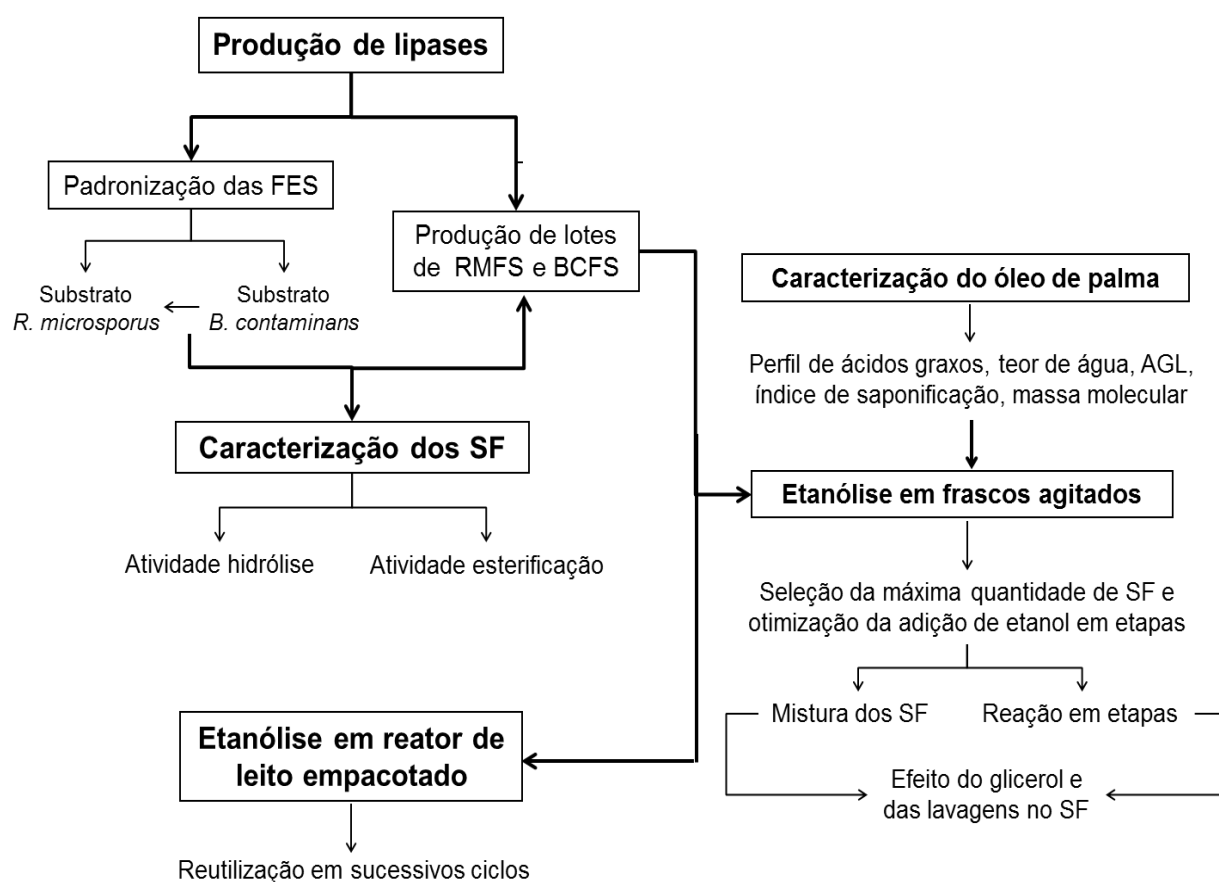


FIGURA 9 – ESTRATÉGIA EMPREGADA NESTE TRABALHO

4. MANUSCRITO

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) do Departamento de Química e no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS) da Universidade Federal do Paraná.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito.

**Biodiesel production strategies for the ethanolysis of palm oil catalyzed by
fermented solids containing lipases produced by *Rhizopus microsporus* and
*Burkholderia contaminans***

Jonathan V. Galeano^a, David Mitchell^a, Nadia Krieger^b

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Cx. P. 19046 Centro Politécnico, Curitiba 81531-980, Paraná, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Cx. P. 19081 Centro Politécnico, Curitiba 81531-980, Paraná, Brazil.

Corresponding author:

Dr. Nadia Krieger. Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Cx. P. 19081 Centro Politécnico, Curitiba 81531-980, Paraná, Brazil.

e-mail: nkrieger@ufpr.br

Tel: ++55 41 33613470

Abstract

Fermented solids containing naturally immobilized lipases from *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (RMFS) and *Burkholderia contaminans* LTEB (BCFS) were obtained by solid-state fermentation using sugarcane bagasse and a mineral nutrient solution containing soybean oil as inducer. These solids were dried, characterized and used directly as biocatalysts in the ethanolysis of the palm oil in a solvent-free system. The transesterification reaction was pre-optimized in vials flasks of 25 mL, containing 14.52 g of palm oil in the reaction medium and 192 U of lipase hydrolytic activity of the fermented solids. To improve the yields of the reaction, the strategies evaluated were: (a) mixtures of fermented solids in three different proportions (3:1, 1:1 and 1:3 with respect to the hydrolysis activity units), (b) ethanol stepwise addition and (c) reactions performed in two stages, removing the glycerol adsorbed onto the fermented solid by washing it with *tert*-butanol or replacing the biocatalyst by a fresh fermented solid. It was found that, by both strategies, the maximum conversions achieved for BCFS and RMFS were 90 and 54%, over 48 h. The assays done with mixtures BCFS and RMFS did not increase the yields of the reaction. The BCFS, compared to RMFS, showed less inhibition by ethanol, higher production of glycerol and less inactivation by products and by-products adsorbed on the solid. Assays in a packed-bed reactor with BCFS in batch mode in a closed-loop system produced a maximum conversion of 89.3% in 30 h at a molar ratio ethanol:oil of 5.5:1 with four steps of ethanol additions and 12% of fermented solid in relation to the palm oil. The BCFS could be reused for 5 reaction cycles up to 74% of relative conversion, with double sequential washings with *n*-hexane and *tert*-butanol at the end of each cycle. The alternative reuse strategy washing with *n*-hexane showed that the glycerol adsorbed on the solid is not the only cause of the decrease of activity. These results are promising and can give new insights on planning and optimizing the use of fermented solids as biocatalysts in biodiesel ester synthesis.

Keywords: Solid-state fermentation, lipases, fermented solids, biodiesel, ethanolysis, palm oil, *Rhizopus microsporus*, *Burkholderia contaminans*.

4.1 Introduction

Due to the growing energy demand, to the reduction of world petroleum reserves, and to the environmental concerns, there is a great demand for alternative fuel sources. Thus, biodiesel presents itself as an environmentally friendly, nontoxic, renewable, and biodegradable fuel alternative with the perspective of replacement the conventional diesel [1,2].

Chemically, biodiesel is composed of a mixture of mono-alkyl esters of long chain fatty acids and is typically produced from renewable sources such as vegetable oils, animal fats and waste oils [3]. Palm oil provides almost a third of global production of vegetable oils because it has the highest oil yield per hectare (e.g., ten times more than soybean oil) [4] and low production costs. Therefore, among all available oils that could be used as feedstock, it could be responsible for the majority of biodiesel production [2].

Conventionally, biodiesel is produced by homogeneous alkaline catalysis in transesterification reactions (alcoholysis) of vegetable oils, given that high reaction rates and high production yields are obtained. However, this process has some drawbacks, like the overconsumption of energy, the need of removal of the catalyst and the treatment of alkaline wastewater, the need of using high quality raw materials and complicated separation and purification of biodiesel [3,5]. Due to this, alternative routes for biodiesel production are being studied. Among these attempts, the enzymatic process with lipases (E.C. 3.1.1.3) is the main ecologically attractive option for generating a cleaner biodiesel and a high quality glycerol, thereby producing less waste products and needing fewer purification steps. Moreover, the enzymatic process can be carried out under mild conditions and allows the reuse of the biocatalyst, when immobilized [5,6].

The main studies in biocatalysis with lipases deal with the cost of lipases, their low reaction rates and inactivation caused by alcohol and adsorption of glycerol on the immobilized lipase [5,7,8]. Among the methods for producing and immobilizing lipases at low cost are the whole

cell systems (lipases anchored to the cell wall) together with extracellular lipases (secreted into the culture medium) which are immobilized by surface adsorption using biomass support particles (BSP) [9–11]. In parallel, there have been performed innovative methods based on solid-state fermentation (SSF) for obtaining extracellular lipase and whole cells (fungi and bacteria) naturally immobilized on low cost porous substrates (e.g., sugarcane bagasse, sunflower seed meal, babassu cake, *Jatropha* seed cake) [12–21]. These fermented solids can be used directly without the need for extraction, purification and immobilization of lipases, in esterification, transesterification (methanolysis or ethanolysis) and hydroesterification reactions for biodiesel production.

In our group, we produced fermented solids by cultivating *Burkholderia cepacia* LTEB11 (recently re-classified as *B. contaminans*) using a 1:1 mixture (by mass) of sugarcane bagasse and sunflower seed meal. The dry fermented solid was used in a packed-bed reactor in solvent-free systems for the ethanolysis of soybean oil by Salum et al. (2010) and in the esterification of fatty acids, obtained from soybean soapstock acid oil, by Soares et al. (2013). The best results in conversion were 95% in 46 h and 92% in 31 h, respectively, both obtained at 50 °C. Zago et al. (2014) produced a fermented solid using *Rhizopus microsporus* with sugarcane bagasse impregnated with an emulsion containing soybean oil and a nutrient medium. The ethanolysis of corn oil with this fermented solid in a packed-bed reactor reached a conversion of 68% in 72 h in a solvent-free system. However, in the transesterification reactions, both solids produced the maximum conversions in very high times, rendering relatively low productivities. Moreover, the reuse of the fermented solids produced by *B. contaminans* was limited to only 3 successive reaction cycles, probably due to the inactivation of the lipases caused by ethanol and glycerol adsorption by the solid [13]. The differences in conversions between these solids could be attributed mainly to the lipase

regioselectivity of each microorganism. The genus *Rhizopus* is known to produce sn-1,3-specific lipase [22,23], whereas the lipase produced by the genus *Burkholderia* are generally non-specific [22,24]. The difference between regioselectivities have been used as strategy to increase conversion by the mixture of lipases that react synergistically [25,26].

In this view, the current work proposes to study and compare the biodiesel production by ethanolysis of palm oil catalyzed by fermented solids from *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (RMFS) and *Burkholderia contaminans* LTEB (BCFS), by monitoring of the reaction kinetic in different reaction strategies and conditions, aiming the higher conversions with higher reaction rates and allowing greater possibilities of reuse.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Reagents and media

The sugarcane bagasse used to prepare the solid-state fermentation media was kindly donated by the company Melhoramentos Norte do Paraná (Paraná, Brazil). The palm oil used as a substrate in the transesterification reaction was provided by Aboissa Óleos Vegetais e Triângulo Alimentos (São Paulo, Brazil). Its composition in fatty acids, as well as its physico-chemical analysis were performed as described in section 2.8. The palm oil had a free fatty acid content of $0.89 \pm 0.05\%$ (m m^{-1}), water content of $0.5 \pm 0.2\%$ (m m^{-1}), saponification value of $174 \pm 4 \text{ mg KOH g}^{-1}$ and molecular weight of $968 \pm 18 \text{ g mol}^{-1}$. The fatty acid profile of palm oil was ($\% \text{ m m}^{-1}$): $43.1 \pm 0.3\%$ palmitic acid (C16:0), $42.1 \pm 1.4\%$ oleic acid (C18:1), $8.2 \pm 0.5\%$ stearic acid (C18:0), $4.6 \pm 0.4\%$ linoleic acid (C18:2), $0.8 \pm 0.1\%$ tetradecanoic acid (C14:0) and $1.2 \pm 0.5\%$ of others. Standards of methyl-esters Supelco® 37 Component FAME Mix, methyl-nonadecanoate (99.8%) and triolein (65%) were from Sigma-Aldrich (St.

Louis, MO). Soybean oil used in the solid-state fermentation was purchased at a local market. All other reagents were of analytical grade and were obtained from Brazilian suppliers.

4.2.2 Strains and Inoculum

A strain of *Rhizopus*, originally isolated in Guadalajara, Mexico, and previously characterized as *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM [27] was maintained at 4 °C in potato dextrose agar (PDA) medium and glycerol. To prepare the inoculum, the strain was grown on PDA at 30 °C for 7 days and the spores were collected with a Tween 80 solution (0.01%, m v⁻¹) until a concentration of 2.25×10^7 spores mL⁻¹ was reached.

Burkholderia contaminans LTEB11 (previously classified as *B. cepacia* LTEB11) was maintained at -18 °C in Luria Bertani (LB) medium with 50% (m v⁻¹) glycerol. A stock culture was transferred to a LB agar plate and incubated for 48 h at 29 °C. Isolated colonies were transferred to 30 mL of LB medium in a 250 mL Erlenmeyer flask and then incubated on a rotary shaker at 29 °C and 200 rpm for 8 h, until reaching absorbance between 0.8 and 1.0 at 600 nm, which represents mid-exponential phase [12]. This culture broth was used as inoculum for solid-state fermentation.

4.2.3 Solid-state fermentation

To prepare of the substrate, the sugarcane bagasse was washed 3 times with tap water, dried at 80 °C for 24 h and sieved to obtain particles between 0.85 and 2.36 mm. The cultivations were done in 500 mL Erlenmeyer flasks with 12 g of bagasse for *R. microsporus* and 10 g of bagasse for *B. contaminans*, which were impregnated, respectively, with 40 and 30 mL of a suspension of soybean oil (20% m m⁻¹ in relation to the bagasse) in a nutrient solution at pH 7.0 [19]. The nutrient solution contained (per liter): 4 g of urea, 5 g of lactose, 5 g of K₂HPO₄,

1 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 4 mL of an oligoelement solution [containing, per liter, 10 g of ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA), 2.0 g of $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2.8 g of $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g of $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, and 0.3 g of $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ at pH 4.0]. The pH of the nutrient solution was adjusted to 7.0 with 10% HCl (v v^{-1}). In both cases, the Erlenmeyer flasks were plugged with cotton wool and autoclaved at 121 °C for 15 min.

For the fermentation with *R. microsporus*, the substrate was inoculated with spore suspension to give 3.7×10^7 spores g^{-1} of dry solid substrate, to give moisture content of 80% (m m^{-1} , wet basis), and incubated for 18 h at 40 °C. For *B. contaminans*, the substrate was inoculated with 2 mL of inoculum (section 2.2), to give moisture of 75% (m m^{-1} , wet basis) and incubated for 72 h at 29 °C.

After the fermentation, the fermented solids were dried in a column with ascending flow of dry air [15], until a moisture content of less than 10% (m m^{-1} , wet basis) determined in an infrared moisture balance (Gehaka IV2000, São Paulo, Brazil). The dry fermented solids were stored in sealed plastic bags at -4 °C and the stability of the lipase activity within the solids was evaluated by measuring of the lipase hydrolytic activity (section 2.4) monthly. These dried fermented solids were used directly in the transesterification reactions.

4.2.4 Characterization of the fermented solids

4.2.4.1 Lipase hydrolytic activity

The lipase hydrolytic activity of the dry fermented solids was assessed by the titrimetric method. The suspension contained triolein (67 mmol L^{-1}), gum arabic 3% (m v^{-1}), CaCl_2 (2 mmol L^{-1}), Tris-HCl (2.5 mmol L^{-1}) and NaCl (150 mmol L^{-1}) in distilled water [28]. It was emulsified with a blender at high speed, initially for 5 min and then for an additional 1 min

immediately before use. For each assay, 20 mL of emulsion and 160 mg of fermented solids were placed in a glass vessel maintained at 40 °C. The free fatty acids (FFA) released during the reaction were titrated for 5 min in a Metrohm 718 STAT Titrino potentiometric titrator (Metrohm, Herisau, Switzerland) with the pH maintained at 7.0 through the addition of a 0.05 mmol L⁻¹ NaOH solution. One unit (U) of lipase hydrolytic activity was defined as the release of 1 µmol of fatty acid per min, under the assay conditions.

4.2.4.2 Lipase esterification activity

To determine the esterification activity, reactions were carried out in 10 mL screw-capped bottles containing 5 mL of a mixture containing 210 mmol L⁻¹ of ethanol and 70 mmol L⁻¹ of oleic acid (molar ratio 3:1 of ethanol:acid) in *n*-hexane and 500 mg of fermented solid. These bottles were incubated on a rotary shaker at 200 rpm and 40 °C. At fixed intervals, samples of the reaction mixture (60 µL) were collected and analyzed for residual free fatty acids by the Lowry–Tinsley method [29]. Each sample aliquot was added to 250 µL of the color reagent (copper acetate (II) 5% v m⁻¹, with pH 6.0 to 6.2 adjusted with pyridine) and the mixture was vortexed. The upper organic layer was removed to reading the absorbance at 715nm and correlated with a calibration curve of oleic acid. Ethyl ester production was indirectly calculated by the consumption of oleic acid from the reaction mixture. One unit (U) of esterification activity equals 1 µmol of oleic acid consumed per min, under the assay conditions. Both hydrolytic and esterification activity were expressed in units of activity per gram of dry fermented solid (U g⁻¹DS).

4.2.5 Ethanolysis reactions in shake flasks

Reactions were carried out in 25 mL vials flasks with plastic caps containing the substrate mixture, composed of ethanol and palm oil at molar ratio ethanol:oil 3:1 or 4.5:1 [45.0 mmol

(2.07 g) and 67.5 mmol (3.11 g) of ethanol, respectively, and 15 mmol (14.520 g) of palm oil]. The mixture was pre-incubated for 5 min in a rotary shaker at 250 rpm at the stated temperature and the reactions were started by adding the dry fermented solid. Samples of the reaction mixture (50 μ L) were collected at intervals and the total ester content was analyzed by GC (section 4.2.8.1).

4.2.6 Washings of the fermented solids and their reuse in cycles of ethanolysis reactions

After being used in the transesterification reactions, the solids were separated from the reaction medium by vacuum filtration and washed before being used in another cycle of reaction. The solvents used for the washings were *n*-hexane and *tert*-butanol, either isolated or in consecutive washings with both solvents. For the washings with *n*-hexane, the solid was stirred in the same vial flasks of reaction for 5 min with 10 mL of the solvent, then filtered and washed on the Buchner funnel with another 10 mL of *n*-hexane. The washes with *tert*-butanol were done in the same way as described for *n*-hexane and the presence of glycerol in the washings was followed by TLC (the final total volume of *tert*-butanol was 40 mL). Finally, the solid was dried in a fume hood at room temperature for 60 min and then in a vacuum desiccator overnight at 4 °C. These washed solids were then used in a fresh transesterification reaction medium and the percentage of the reaction conversion at 48 h was determined and expressed relative of the conversion obtained in the first cycle of reaction.

4.2.7 Ethanolysis reactions in packed-bed reactor

After selecting the best conditions obtained in shake flasks, the transesterification reaction was performed in a packed-bed reactor (PBR) in batch mode (discontinuous) in a closed-loop system, according to Soares et al. [15] . The system comprises a reservoir of the reaction

medium and a jacketed glass column (2.7 cm inner diameter and 21 cm high) with recirculating water to maintain the temperature of the reaction medium. The column was filled with 12 g (wet weight) of dried fermented solid corresponding to the bed height of 16 cm. The reservoir was filled with palm oil (100 g and 82 g, respectively for the experiments of 12% and 15% of oil in relation to the fermented solid) and was circulated in an upward flow of 5 mL min^{-1} through the column using a peristaltic pump, model 45MHP10 (Metex Corporation, Buffalo, New York, USA). The ethanol was added in steps and the reaction was started with the first ethanol addition. The number of steps (three or four) and times of ethanol addition, as well as the temperature varied according to the experiment. After the first ethanol addition, the residence volume of the reaction medium in the reservoir was determined and the flow was proportionally adjusted after each step of ethanol addition to keep a constant residence time of 6 min in the reservoir. During the reaction, at fixed times, samples of the reaction medium (50 μL) collected and analyzed by GC for total ester content.

4.2.8 Analytical methods

4.2.8.1 Total ester content

The total ester content in the samples from the transesterification reactions was determined by gas chromatography (GC) using a gas chromatograph GC-2010 (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) equipped with a hydrogen flame ionization detector and a SGE HT-5 capillary column (0.32 mm internal diameter, 25 m length and 0.1 mm film thickness). The chromatograms were recorded and analyzed with the software of Shimadzu GC Real Time ® (version 2.3). Prior analysis, samples were heated in oven with air extractor at 60 °C for at least 4 h for ethanol evaporation and centrifuged at $10000 \times g$ for 15 min. Prepared sample (10 mg) was diluted in 0.5 mL of an internal standard solution of fatty acid methyl esters (FAME), methyl-

nonadecanoate (C19:0, 1 mg mL⁻¹) in *n*-heptane. Then, 1 µL was injected with a split ratio of 1:50, using N₂ as the carrier gas. A selective injection was done: the injector was set at 240 °C for 5 min for esters injections and heating at 40 °C min⁻¹ to 350 °C for remaining sample injection (glycerides). The detector was set at 360 °C. The oven column program was as follows: 150 °C for 1 min, heating at 15 °C min⁻¹ to 210 °C, at 5 °C min⁻¹ to 230 °C, at 40 °C min⁻¹ to 350 °C and maintained for 5 min.

For every set of analysis, the relative response factor (RRF, Equation 1) was determined taking into account the external standard of analyte [30] (mixture of the majority FAEE standards of the characterized palm oil, C16:0, C18:1, C18:2) and the internal standard (FAME C19:0). The total ester content in mass percent (% FAEE) was determined relative to the peaks areas of the esters of palm oil and the internal standard peak [31] in the chromatograms (Equations 1 and 2):

$$RRF = \frac{A_{IS}}{\sum A_{ES}} \times \frac{W_{ES}}{W_{IS}} \quad (\text{Equation 1})$$

$$\% FAEE = \frac{\sum A - A_{IS}}{A_{IS}} \times \frac{W_{IS}}{W} \times 100 \times RRF \quad (\text{Equation 2})$$

where, $\sum A$ and $\sum A_{ES}$ are the total peaks areas from the ethyl esters and external standard respectively, A_{IS} is the peak area corresponding to internal standard, and W , W_{ES} , W_{IS} corresponding to weight in milligrams of the sample, external and internal standard respectively. The productivity of the transesterification reaction was determined for the maximum conversion and the time to achieve it, and was expressed as the amount of ester produced per gram of dry fermented solid per hour (mg g⁻¹DS h⁻¹).

4.2.8.2 Fatty acid profile of the palm oil

To determinate the fatty acid profile of palm oil, at first, its fatty acid methyl esters (FAME) were obtained, according to the methodology of Hartman and Lago [32]. Its fatty acid profile was determined by GC by comparison with the profiles of the palm oil FAME and the standard of methyl esters Supelco® 37 FAME Mix. A gas chromatograph GC-2010 (section 2.8.1) was used and the analytical method parameters indicated by the certificate of analysis of the standard. The injector was set at 250 °C and the detector was set at 260 °C. The column program was: 100 °C for 5 min, heating to 240 °C at 4 °C min⁻¹ and hold at 240 °C for 5 min. Then, 1 µL of each sample were injected with a split ratio of 1:50 using N₂ as the carrier gas.

4.2.8.3 Analysis of glycerol and ethanol

Glycerol and ethanol were quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) by external standardization using the chromatographic system Agilent 1260 Infinity Bio-Inert Quaternary LC System (*Agilent Technologies*, USA), with autosampler column oven heating and refractive index detector (RID). The methodology was adapted from Li et al. [33]. An ion exchange column Hi-Plex Ca (*Agilent Technologies*, Waldbronn, Alemanha) maintained at 65 °C was used. The injection volume was 20 µL, the mobile phase used was sulfuric acid 5 mmol L⁻¹ at flow of 0.55 mL min⁻¹ and the RID was adjusted at 40 °C. For the preparation of the reaction medium samples, 500 mg of sample was added to 1 mL of water, vortexed and centrifuged at 10000 ×g for 20 min. The lower aqueous phase was used for the analysis. Samples of the washings of the fermented solids (section 4.2.6) were prepared similarly, with 200 µL of the sample added in 4 mL of water. The RID signal was processed by Agilent Open LAB Chromatography Data System software.

4.2.8.4 Physico-chemical analysis of palm oil

The following parameters were determined according to the methods of the American Oil Chemist's Society (AOCS Official Method): the fatty acid content and acid values by alkaline titration [34], the water content by colorimetric method Karl-Fischer [35] and the saponification value by acid titration of the saponification products [36]. From the saponification value (SV) the molecular weight of palm oil (M_{PO}) was calculated:

$$M_{PO} = \frac{3 \times M_{KOH}}{SV} \quad (\text{Equation 3})$$

where, M_{PO} is the molecular weight of KOH.

4.3 Results

4.3.1 Production and characterization of the fermented solids

Previously, *Burkholderia contaminans* fermented solid (BCFS) was produced using a mixture (1:1) of sugar cane bagasse and sunflower seed meal (condition B) [13,15]. In order to standardize the substrates and obtain fermented solids with similar physical characteristics, the sunflower seed meal used as substrate of the previous fermentation conditions of *B. contaminans* [15] was replaced by a nutrient solution and soybean oil used for *R. microsporus* (condition R) [14].

The hydrolytic lipase activities were 171 U g⁻¹DS for RMFS and 160 U g⁻¹DS for BCFS produced under similar substrate mixture. With BCFS in the new conditions (condition BR) there was an increase of 8.8% in the hydrolytic lipase activity as compared with the produced

using the previous conditions (**Table 1**), but the esterification activity remained the same. It is worth noticing that RMFS presented an esterification activity of approximately 2.3 times higher than that of BCFS.

Table 1. Solid state fermentation standardized conditions for *Rhizopus microsporus* and *Burkholderia contaminans* and lipase hydrolytic and esterification activities of the fermented solids.

	<i>Rhizopus microsporus</i>	<i>Burkholderia contaminans</i>	
Conditions:	R	B	BR
Sugarcane bagasse dry (g)	12	5	10
Sunflower seed meal (g)	---	5	---
Nutrient solution (mL)	40	---	30
Buffer 0.1M pH 7.0 (mL)	---	30	---
Soybean oil (g)	2.4	---	2.0
Inoculum (mL)	20	1	2
Activity			
Hydrolysis (U g ⁻¹ DS)	171 ±8	146 ±4	160 ±6
Esterification (U g ⁻¹ DS)	16 ±1	6 ±1 ^a	7 ±1 ^a

^a Values with not significant differences ($p > 0.05$). The moisture values of the fermentations were maintained at 80% for *R. microsporus* and 75% for *B. contaminans*. BR: *B. contaminans* cultivated with the same substrate as for *R. microsporus*.

Both dried RMFS and BCFS were evaluated for the stability of the activities when stored at -4 °C in sealed plastic bags. Both fermented solids kept above 80% of their initial hydrolytic activities and above 70% of their esterification activities after 7 months of storage, with similar stability profiles for both hydrolytic and esterification activities, being the activities of BCFS slightly more stable than that of RMFS (**Fig. 1**).

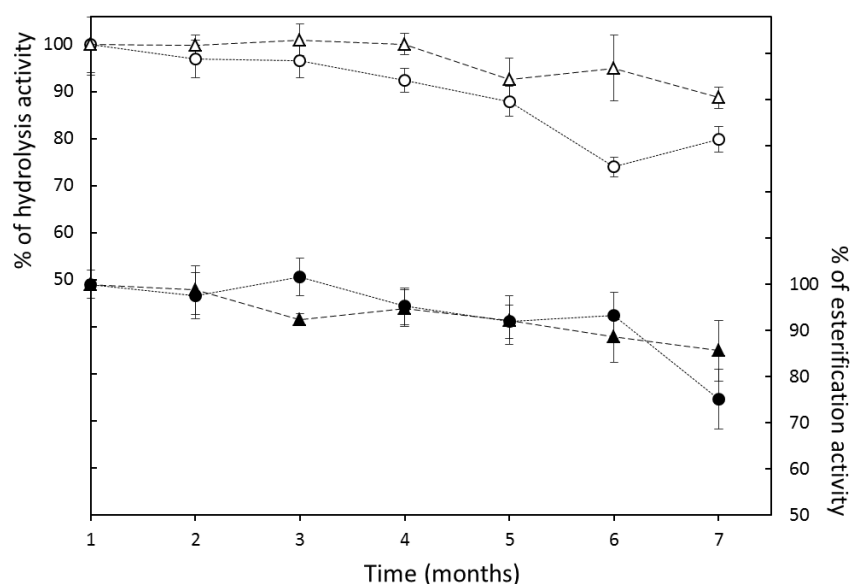


Fig. 1. Stability of lipase activity in the fermented solids of *Rhizopus microsporus* (O and ●) and *Burkholderia contaminans* (Δ and ▲) during the storage in sealed plastic bags at -4 °C. Residual activities of hydrolysis (open symbols) and esterification (closed symbols). Values plotted represent the mean of triplicate analyses \pm the standard error of the mean.

4.3.2 Ethanolysis reactions in shake flasks

4.3.2.1 Determination of the maximum amount of fermented solid

The effect of the mass of the fermented solid added to the reaction medium (between 6.2 to 9% in relation to the palm oil) on the percentage conversion was evaluated. No significant differences were found ($p > 0.05$) when 8 and 9% (m m^{-1}) of the solids were added to the reaction medium, being found around 50% and 70% conversion after 48 h, respectively, for BCFS and RMFS (**Table 2**). Experiments with higher masses of the fermented solids were not done, given that high amounts of solids rendered the reaction medium difficult to homogenize and to collect samples.

Table 2. Effect of the mass of the fermented solids of *Rhizopus microsporus* (RMFS) and *Burkholderia contaminans* (BCFS) in the percentage conversion of palm oil in shake flasks

Fermented Solid			Hydrolysis Units	Esterification Units	Conversion to FAEE (%)	Productivity (mg g ⁻¹ DS h ⁻¹)
(% m m ⁻¹)	(g)					
6.2	0.90	RMFS	153	14	41 ±2	138 ±8
		BCFS	143	6	61 ±2	204 ±7
8.0	1.16	RMFS	199	19	52 ±2 ^a	135 ±5
		BCFS	185	8	68 ±3 ^b	177 ±8
9.0	1.31	RMFS	223	21	49 ±2 ^a	115 ±4
		BCFS	208	9	72 ±2 ^b	167 ±5

Reactions conditions: molar ratio ethanol:oil 3:1, ethanol addition in two steps (1.5 mole-eq. at 0 and 12 h), 50 °C and 250 rpm by 48 h. FAEE: fatty acid ethyl ester. ^{a,b} Values with not significant differences found (p >0.05).

4.3.2.2 Kinetics of the ethanolysis of palm oil with stepwise ethanol addition

The effect of the ethanol:oil molar ratio (3:1 and 4.5:1) and of stepwise ethanol addition during the transesterification reaction were evaluated. The masses of the fermented solids added to the reaction medium were minimum 8% of BCFS and RMFS, to give a total average of 192 lipase hydrolytic activity units, corresponding to 18.3 and 8.3 lipase esterification activity units for RMFS and BCFS, respectively. The temperature of the reactions was 50 °C and the ethanol additions were done in mole-equivalents (mole-eq.) of ethanol related to the palm oil (15 mmol of ethanol = 1 mole-eq.).

With a molar ratio of 3:1, a single ethanol addition at the beginning (at 0 h) of the reaction was deleterious, particularly for RMFS that produced a minimum percentage conversion (5.2%) in 48 h. In the same time, BCFS produced 65.6% conversion, showing that it is less prone to deactivation by excess of ethanol in the reaction medium.

Due to these results, in further experiments (**Fig. 2A**), the time of second ethanol addition (1.5 mole-eq.) varied for BCFS (6 h) and RMFS (12 h). In spite of the differences in the kinetics

of the reactions at molar ratio of 3:1, when ethanol was added in 3 steps, the percentage conversions were similar to the 2 steps after 48 h for both BCFS (78%, $p > 0.05$) and RMFS (51%, $p > 0.05$).

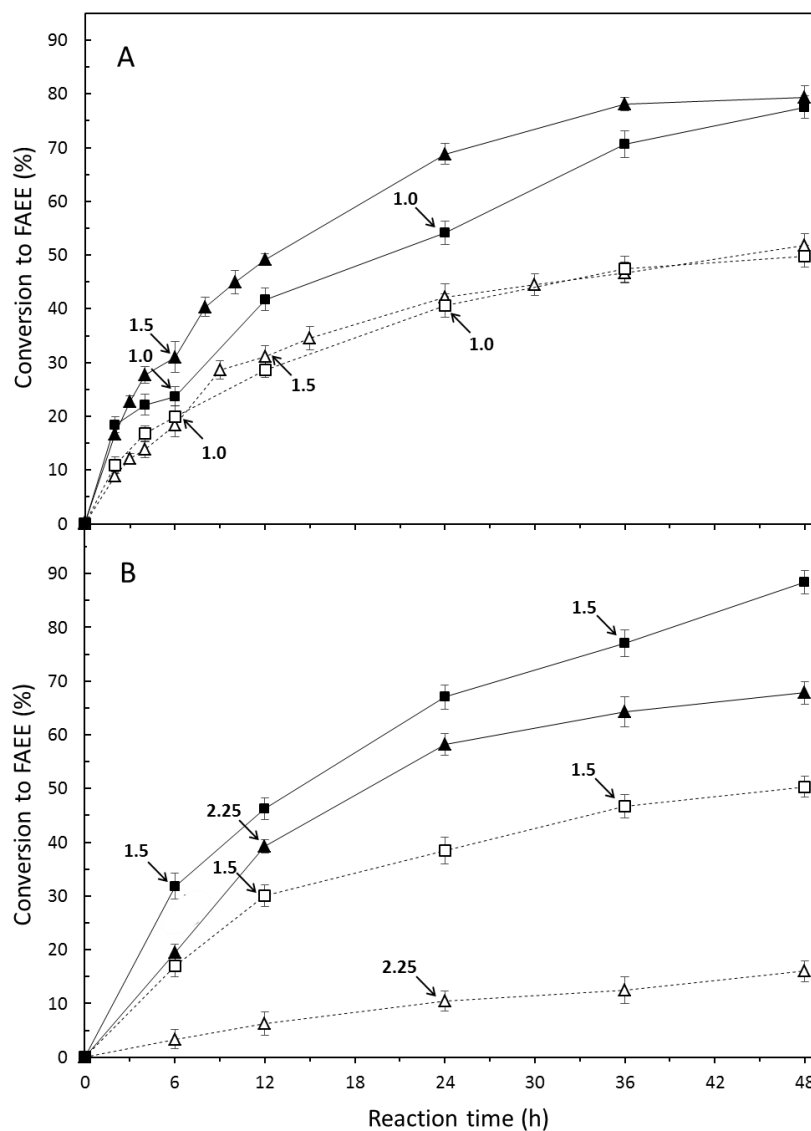


Fig. 2. Effect of ethanol stepwise addition on the kinetics of ethanolysis of palm oil catalyzed by the fermented solids of *Rhizopus microsporus* and *Burkholderia contaminans* with molar ratio ethanol:oil A) 3:1 and B) 4.5:1. Keys: *R. microsporus*, ethanol addition in 2 (Δ) and 3 (□) steps; *B. contaminans*, ethanol addition in 2 (▲) and 3 (■) steps. Reactions conditions: 50 °C, 250 rpm and 192 U of lipase hydrolytic activity. Each arrow represents the ethanol additions in mole-eq. after the initial addition in 0 h. Values plotted represent the mean of triplicate experiments \pm the standard error of the mean.

For the molar ratio of 4.5:1 (**Fig. 2B**) with ethanol addition in 2 steps, the first addition (2.25 mole-eq. at 0 h) decreased the initial rate of conversions for both BCFS and RMFS in comparison with the ratio 3. Because of this, the second ethanol addition (2.25 mole-eq) was delayed for 12 h for BCFS and 24 h for RMFS. However, the conversions were lower than that obtained when ethanol was added in 3 steps (1.5 mole-eq. at 0, 6 and 36 h). The third ethanol addition with BCFS allowed an increase of the conversion to $88.4 \pm 2\%$ in 48 h, while for RMFS it did not make a significant difference ($50.3 \pm 2\%$) (**Fig. 2B**). It is worth noticing that, in spite of the higher esterification activities presented by RMFS ($16 \text{ U g}^{-1}\text{DS}$) in comparison to BCFS ($7 \text{ U g}^{-1}\text{DS}$), the latter produced a higher percentage conversion and reaction rate than RMFS. This could probably due to the fact that lipases of RMFS are more prone to inactivation by ethanol, as was observed before by Zago et al. (2014).

4.3.2.3 Effect of the mixture of the fermented solids

The effect of mixtures of BCFS and RMFS was studied in order to attempt to increase the reaction rates and percentage conversions. Mixtures ratios of RMFS: BCFS (3:1, 1:1, 1:3) were prepared based on the total hydrolytic activity added to the reaction medium (192 U). The ethanol addition was done in 2 steps, at the beginning of the reaction and at 6 or 12 h.

When the second ethanol addition (1.5 mole-eq.) was done at 12 h, the percentage conversions in 48 h were 63.2, 72.1 and 73.4% for the mixtures of 3:1, 1:1 and 1:3, respectively (**Fig. 3A**). These values were higher than the theoretical percentage conversion expected for the mixtures (55.6, 59.4 and 63.2%, respectively), calculated based on the maximum conversion obtained when isolated solids were used; even the conversions obtained for the mixtures 1:1 and 1:3 were higher than the conversion obtained for the isolated BCFS (67%), indicating a conjunct action or a synergistic effect of the fermented solids. This effect

can be observed when the reaction catalyzed by BCFS reached the plateau for the first 1.5 mole-eq. at 29% conversion in approximately 6 h, but with the mixtures, the conversion keeps increasing, giving even higher conversion, reaching up to 40% at 12 h in the mixture 1:1.

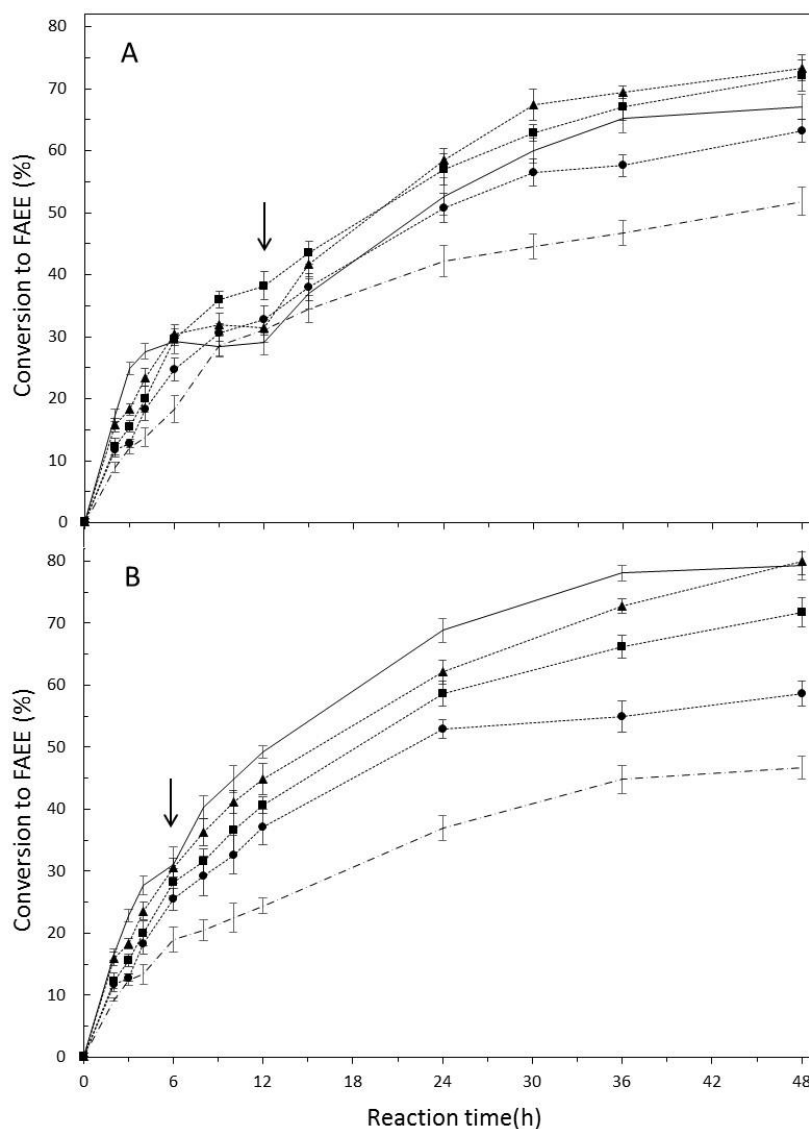


Fig. 3. Effect of the mixture of the fermented solids of *Rhizopus microsporus* (RMFS) and *Burkholderia contaminans* (BCFS) on the kinetics of ethanolysis of palm oil with molar ratio ethanol:oil 3:1, with ethanol addition in two steps (A) at 0 and 12 h and (B) at 0 and 6 h. Keys: (--) RMFS, (—) BCFS, (●) RMFS:BCFS 3:1, (■) RMFS:BCFS 1:1, (▲) RMFS:BCFS 1:3. Reactions conditions: 50 °C, 250 rpm and 192 U of lipase hydrolytic activity. Values plotted represent the mean of triplicate experiments \pm the standard error of the mean.

When the reaction was performed with the second ethanol addition at 6 h (**Fig. 3B**), the percentage conversions of 58.6, 71.7 and 79.9%, respectively for the mixtures of 3:1, 1:1 and 1:3, were also higher than the expected conversion (54.9, 63.0 and 71.2%, respectively), but the effect was less pronounced. Only the mixture 1:3 reached the same conversion that the isolated BCFS (79.3%) in this conditions.

4.3.2.4 Glycerol and ethanol retention in the fermented solids

During the course of reactions, it was visually observed an accumulation of glycerol on both RMFS and BCFS. As it was also possible that more hydrophobic compounds such as esters and fatty acids were adsorbed on the fermented solids, a first washing with *n*-hexane was done, followed by a second washing with *tert*-butanol (see section 4.2.6). The glycerol and ethanol content in the filtrates from *tert*-butanol (extracted from the fermented solid) and in the reaction medium were determined by HPLC (section 4.2.8.3).

The total glycerol produced was considered as the sum of the content extracted from the fermented solid and of the reaction medium. The yield of glycerol production was calculated as the ratio between the theoretical glycerol yield expected for the reactions at stoichiometric molar ratio of 3:1 and the total produced glycerol (**Table 3**). For BCFS, the yield of glycerol was 61% and for RMFS, it was 34%. BCFS has nearly a total adsorption (98%) of the glycerol produced and 28% of residual ethanol on the fermented solids as compared to RMFS, that just adsorbs 75% of glycerol and 13% of ethanol. The mixture RMFS:BCFS 1:1 decreases the production of glycerol and therefore its adsorption on the solid decreases slightly over 10% with relation to BCFS.

The higher glycerol yields obtained for BCFS could be related to the fact that lipases from *Burkholderia* genus are non-specific and react faster, producing the ester and glycerol,

whereas, the lipases from the *Rhizopus* genus, being known as *sn*-1,3-specific would preferentially produce the intermediates di- and monoacylglycerols and the ester [37]. The fact that glycerol was produced when RMFS was used shows that probably an acyl migration takes place, as suggested by Li et al.[38] and Tran et al. [39].

Table 3. Glycerol and ethanol contents during the ethanolysis of palm oil with the fermented solids of *Rhizopus microsporus* (RMFS) and *Burkholderia contaminans* (BCFS) and their distribution between the reaction medium and the fermented solid.

	RMFS ^a		BCFS ^b		RMFS:BCFS 1:1 ^b	
Time	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Conversion to FAEE (%)	38.5	49.1	67.0	79.3	58.1	70.2
Glycerol						
Total expected ^c (mg)	532	678	925	1095	802	970
Total produced (mg)	223	233	574	665	234	368
Yield (%)	42	34	62	61	29	38
Reaction medium (%)	24	25	3	2	24	13
Fermented solid (%)	76	75	97	98	76	87
Ethanol						
Total remainder (mg)	1011	798	595	342	535	409
Reaction medium (%)	74	87	63	72	89	64
Fermented solid (%)	26	13	37	28	11	36

Reactions conditions: molar ratio ethanol:oil 3:1, 50 °C, 250 rpm and 192 U of lipase hydrolytic activity. (a) Reaction with the second ethanol addition at 12 h and (b) 6 h. (c) Calculated with respect to 100% conversion, which yields 1381 mg of glycerol (15 mmol = 1 mole-eq.).

4.3.2.5 Washing effect on the reuse of the fermented solids

After a first transesterification reaction cycle with BCFS, RMFS and a mixture 1:1 of both fermented solids, the solids were recovered by filtration and washed either with isolated *n*-hexane or *tert*-butanol, or with sequential washings of each solvent. After the washings, the solids were recovered and used in another cycle of ethanolysis and the results were compared with those obtained for the same solids without washing.

The best relative conversion percentage in the second cycle was obtained for BCFS (91%, **Fig. 4**), followed by the mixture of 1:1 of RMFS:BCFS (73%), using *n*-hexane and *tert*-butanol sequential washings. The controls (solids without washing) for BCFS, RMFS and the mixture 1:1 of BCFS:RMFS showed very low percentage conversions (between 14 and 23%). The low percentage conversions showed by RMFS in the second cycle, even after being washed with *n*-hexane (36%) and *tert*-butanol (33%), suggests that the lipase of the fermented solid was irreversibly denatured during the transesterification reaction. The fact that the best results were obtained with washings using *n*-hexane and *tert*-butanol indicates that non-polar compounds such as residual triglycerides, esters and mono and di-glycerides, and polar compounds such as glycerol and ethanol must be removed from the solids before attempting a new reaction cycle.

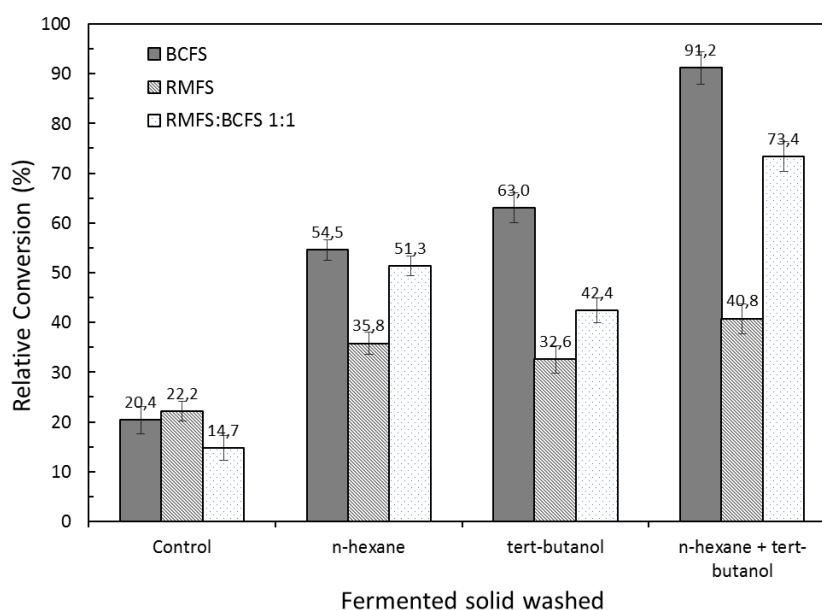


Fig. 4. Second cycle of the ethanolysis of palm oil with the fermented solids of *Rhizopus microsporus* (RMFS), *Burkholderia contaminans* (BCFS) and mixture of solids (RMFS:BCFS 1:1) after different washing procedures. Reactions conditions: molar ratio ethanol:oil 3:1, ethanol addition on two steps, 50 °C, 250 rpm and 192 U of lipase hydrolytic activity. Values plotted represent the mean of duplicate experiments \pm the standard error of the mean.

4.3.2.6 Ethanolysis reactions in two stages

To estimate whether the glycerol adsorption on the solid was responsible for the stopping of the reaction, a first stage of the ethanolysis reactions with molar ratio ethanol:oil 3:1 were performed for both BCFS and RMFS with an interruption when the plateau was reached. The fermented solids were recovered by filtration, washed with *tert*-butanol and dried (as described in section 2.6) and then used to continue the ethanolysis (second stage) in the same reaction medium. The reaction conditions were adapted for the recovered reaction medium, that is, the ethanol concentration was adjusted to give a molar ratio 3:1 in relation to the residual palm oil in the reaction medium (**Fig. 5**). There was a significant increase in the percentage conversion for BCFS, from $74 \pm 2\%$, obtained when the reaction was interrupted (48 h, before the washing) to $91 \pm 2\%$, obtained in 72 h. The increase obtained for RMFS in the same conditions, was from $48 \pm 2\%$ to $54 \pm 2\%$ in 60 h, when a new plateau was reached.

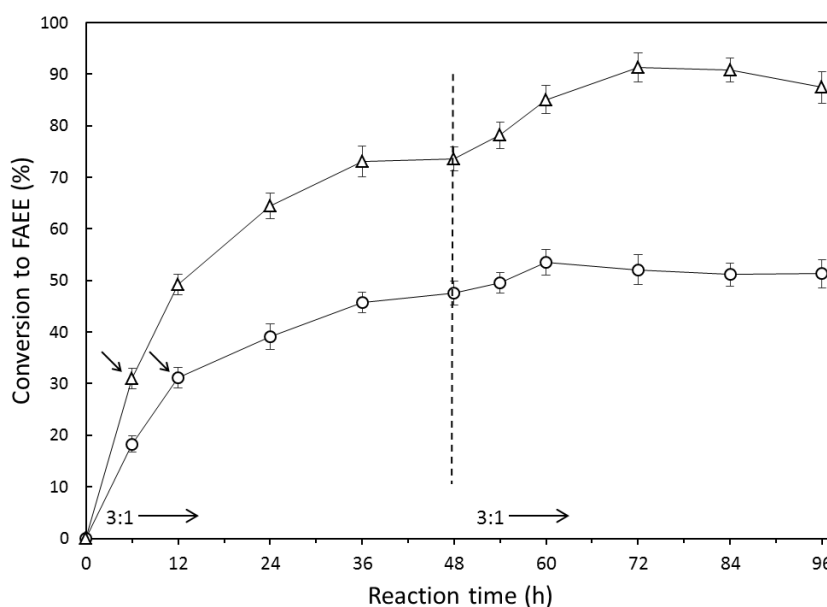


Fig. 5. Ethanolysis of palm oil with the fermented solids of *Rhizopus microsporus* (O) and *Burkholderia contaminans* (Δ) with an intermediate step for glycerol removal. Reactions conditions: molar ratio ethanol:oil 3:1, 50 °C, 250 rpm and 192 U of lipase hydrolytic activity. Each arrow represents the respective ethanol additions. Values plotted represent the mean of triplicate experiments \pm the standard error of the mean.

Other experiments were done in order to increase the conversion (**Fig. 6**), in which, after a first stage of 24 h, the fermented solid was removed by vacuum filtration and a fresh fermented solid was added to the reaction medium for a second stage. Different combinations between RMFS and BCFS were assayed. Based on the residual reaction medium, were adjusted both the amount of the fresh fermented solids to keep the same ratio used before (192 U /14.52 g oil), as the ethanol concentration to give the molar ratio 1.5:1 and 3:1 in the second stage (or total molar ratio 4.5:1 and 6:1, respectively). From this time on, the ethanol was added in two further steps, at the beginning (24 h) and at 36 h.

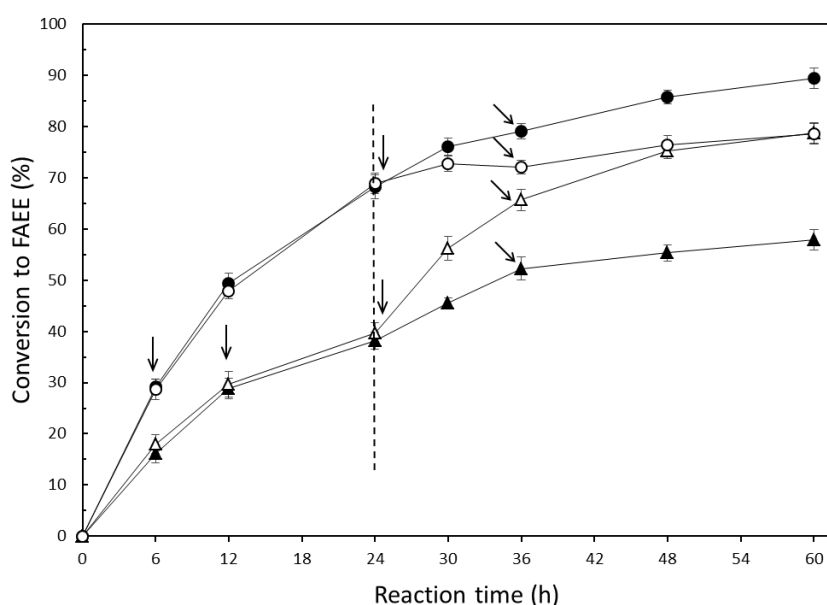


Fig. 6. Ethanolysis of palm oil in two stages with replacements of the fermented solids of *Rhizopus microsporus* (RMFS) and *Burkholderia contaminans* (BCFS) after a first stage (24 h) by a fresh batch of fermented solids. Keys: (▲) RMFS→RMFS, (△) RMFS→BCFS, (●) BCFS→BCFS, (○) BCFS→RMFS. Reactions conditions: total molar ratio ethanol:oil of 4.5:1, 50 °C, 250 rpm and 192 U lipase hydrolytic activity by 14.52 g of oil. Each arrow represents the respective ethanol additions. Values plotted represent the mean of duplicate experiments \pm the standard error of the mean.

The best conversion ($89.5 \pm 2\%$, 60 h) was obtained using BCFS in the first 24 h, followed by the addition of a fresh batch of BCFS when the total molar ratio was 4.5:1 (3:1 with 1.5:1)

(**Fig. 6**). This result was not better than the previous one, presented in Fig. 5 ($91 \pm 2\%$), when BCFS was washed to remove glycerol.

In summary, the best strategy and conditions that allowed a higher conversion with fewer operational steps in shake flasks was the reaction performed in a batch of one stage with BCFS ($88.4 \pm 2\%$ in 48 h) in molar ratio ethanol:oil of 4.5:1, with ethanol addition in 3 equivalents steps (at 0, 6 and 36 h).

4.3.3 Ethanolysis reactions in packed-bed reactor

In the packed-bed reactor (PBR), initially experiments were done with both fermented solids (BCFS and RMFS) separately, using the best conditions obtained in shake flasks. During the reaction in shake flasks, the temperature of the reaction was kept in $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ in order to render the reaction medium more fluid, given that palm oil has a high viscosity (e.g., $39.6\text{ mm}^2\text{ s}^{-1}$ at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, compared with $32.9\text{ mm}^2\text{ s}^{-1}$ for soybean oil [3]). Nevertheless, during the course of the reaction, it was observed that viscosity of the reaction medium decreased. In view of this, a preliminarily experiment was done in shake flasks, keeping the initial temperature at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 h and then decreasing it to $44\text{ }^{\circ}\text{C}$, which was the optimum temperature for the transesterification of soybean oil used by Salum et al (2010). The conversions obtained did not change with this modification in the temperature (data not shown) and it was then used in the experiments in the PBR, because lower temperatures can protect the lipase from denaturation and the energy consumption of the process would be lower.

The first experiment with BCFS (12% in relation to the palm oil mass) was done under the best conditions obtained in shake flasks [(molar ratio of 4.5:1, ethanol addition at 0, 6 and 36 h and a gradient of temperature (3 h at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and then $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the end)]. The maximum

conversion was 84.8% in 48 h, which give a productivity of $147 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (**Fig 7**). This conversion was lower than the 88.4% obtained in 48 h (Fig. 2B) in shake flask (productivity of $221 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). In another experiment, when the times of ethanol addition were changed to 0, 4 and 10 h and an extra 1.0 mole-eq. was added at 22 h to give the molar ratio 5.5:1, the conversion increased to 89.3% in 30 h (productivity of $248 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (**Fig 7**). Experiments done with 15% of BCFS (in relation to the palm oil mass), produced similar conversions and kinetic behavior (data not shown), but with lower productivities ($169 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Similarly to the results of experiments in shake flasks, for the experiments performed with RMFS, a third ethanol addition (1.0 mole-eq.) did not lead to higher conversions after the plateau was reached. Instead, the maximum conversion was lower (45% in 48 h) than in shake flask (51%, Fig. 2).

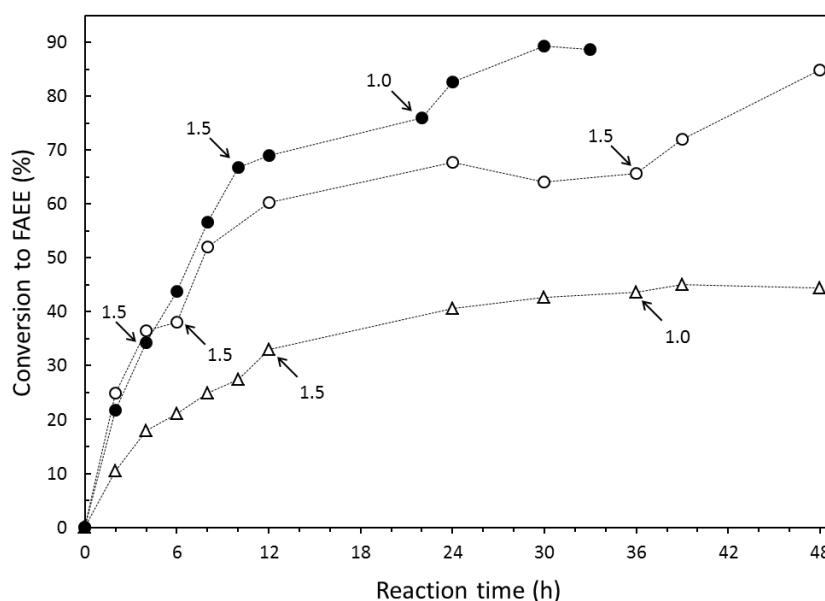


Fig. 7. Effect of ethanol stepwise addition on the ethanolysis of palm oil with the fermented solids of *Rhizopus microsporus* (RMFS) and *Burkholderia contaminans* (BCFS) in packed-bed reactor. Keys: (Δ) RMFS with molar ratio ethanol:oil 4:1, (○) BCFS with molar ratio 4.5:1, (●) BCFS with molar ratio 5.5:1. Reactions conditions: 12% of fermented solid (m m^{-1} expressed in relation to oil), 50°C for 3 h and lowered to 44°C . Each arrow represents the respective ethanol additions in mole-eq. after the initial addition in 0 h.

4.3.3.1 Reuse cycles of the fermented solid produced by *Burkholderia contaminans*

The results obtained in shake flasks (**Fig 4**) showed that the washing of BCFS with *n*-hexane followed with *tert*-butanol rendered a relative conversion of 91% in the second use of the fermented solid. This strategy was applied in the PBR, with washings after every reaction cycle (of 30 h) with 75 mL of *n*-hexane and 150 mL of *tert*-butanol in a downward flow of 3 mL min⁻¹. After the washings, the BCFS in the column was dried with downward flow of dry air by 2 h. The relative conversion between cycles was decreasing until reach 74% in the fifth cycle (**Fig. 8**). An alternative experiment was done, in which the sequential washings were done just in *n*-hexane to allow the glycerol accumulation between the cycles. The relative conversion decreased faster after each cycle, and hence, in the fourth cycle, the conversion

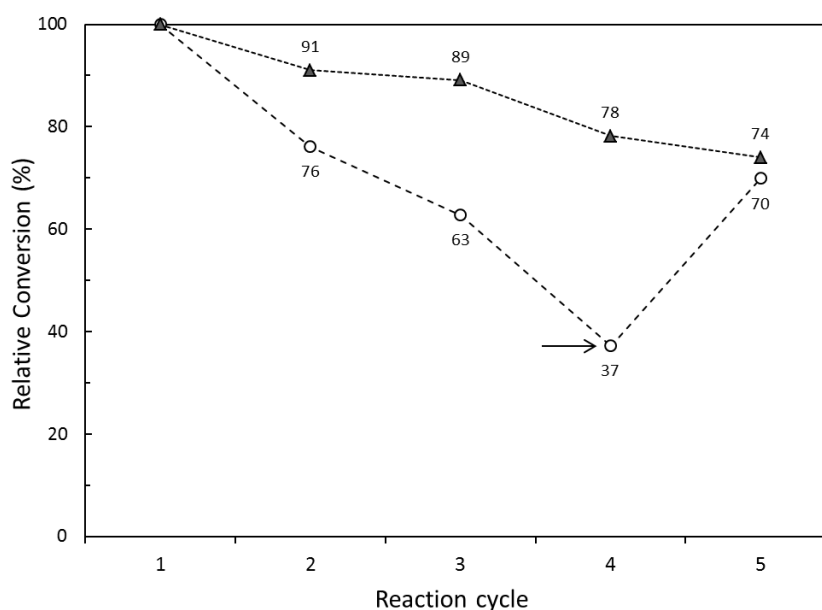


Fig. 8. Cycles of reuse of the fermented solids of *Burkholderia contaminans* in the ethanolysis of palm oil, with washings after the reaction in (▲) both *n*-hexane and *tert*-butanol and in (○) *n*-hexane by three cycles and final washing (arrow) in *n*-hexane and *tert*-butanol after the fourth cycle. Reactions conditions: 12% of fermented solid (m m⁻¹ expressed in relation to oil), 50 °C for 3 h and lowered to 44 °C.

was only 34%. At the end of this cycle, after the washing with *n*-hexano, a washing with *tert*-butanol (arrow in the **Fig. 8**) was also done in order to remove the accumulated glycerol. After this step, the relative conversion was recovered up to 70% in the fifth reaction cycle.

4.4 Discussion

In our work, we studied the ethanolysis of palm oil in a solvent-free medium catalyzed by fermented solids produced by *Burkholderia contaminans* and *Rhizopus microsporus*. The conditions in shake flasks in one stage or batch reaction with BCFS produced the higher conversion of $88.4 \pm 2\%$, with molar ratio of 4.5:1 and ethanol addition in 3 equivalents steps (at 0, 6 and 36 h). This condition were then adapted to the packed-bed reactor (PBR), and the highest conversion of 89% in 30 h was obtained by anticipating the second and third ethanol addition [because of the higher percentage of solid (12%) in PBR than that of shake flasks (8-9%)] and by an extra addition of ethanol (1.0 mole-eq) when the reaction reached a plateau.

The dry fermented solid produced by *B. contaminans* has been successfully used in the transesterification of soybean oil [13] and in the esterification of a free fatty acid mixture produced by hydrolysis in subcritical water of soybean acid oil [15], with high conversions (95% in 46 h and 92% in 31 h, respectively). Nevertheless, it was never used in the transesterification of palm oil. On the other hand, palm oil should be the preferable choice to produce biodiesel, given that it is not only very abundant (a third of the global production of vegetable oils), but its yield per hectare is 10 times higher than that of soybean oil, making it an inexpensive feedstock for the production of biodiesel [2,4].

Enzymatic studies of transesterification of palm oil in solvent-free system are relatively scarce (**Table 4**) and they mainly use methanol, commercial immobilized enzymes, molar ratios

alcohol:oil above 4:1, average temperature of 40 °C and shake flasks. The reports on the ethanolysis of palm oil are even scarcer: beside our work, there is only one report using a commercial immobilized lipases: from *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK) and *Burkholderia cepacia* (Lipase PS), in which 98% and 75% of conversion was achieved in 72 h of reaction, respectively [40]. Interestingly, these authors used a very high molar ratio of 18:1 in comparison to the lower ethanol:oil molar ratio used in our process (5.5:1). This lower ratio is preferable due to its potential to reduce the inactivating effect of ethanol and the costs of the enzymatic process. Moreover, the use of ethanol in the production of biodiesel, in spite of its lower reactivity in comparison to methanol, is convenient for Brazil, given it is the second world ethanol producer, with 6190 millions of gallons produced in 2014 [41]. In addition, ethanol is non-toxic and obtained from renewable sources, as sugarcane.

Our conversion levels do not match that obtained in the methanolysis of palm oil using the commercial lipase CALB (Novozym 435, 97% in 35 h) [42]. However, comparing our results with those for non-commercial lipases, conversions of 88% in 48 h in shake flasks and 89% in 30 h in PBR are better than those obtained for the whole cells of *Rhodotorula mucilaginosa* (83% in 72 h in shake flasks) [43] and of *Aspergillus niger* immobilized on PSB (90% in 72 h in PBR) [44]. It is worth mentioning that our process is not yet optimized and therefore, there is still room for its improvement.

Our aim in comparing the two fermented solids was to determine whether RMFS could have a similar or even better performance than BCFS. This could make the scale-up process for the production of the fermented solid easier and cheaper, considering that the cultivation of *R. microsporus* in a bioreactor would not require measurements of safety containment, since the genus *Rhizopus* is considered safe (GRAS), whereas the genus *Burkholderia* is an opportunistic pathogen in humans [45].

Our attempts to use mixtures of fermented solids produced by *B. contaminans* and *R. microsporus* to catalyze the transesterification of palm oil aimed to increase the reaction rates, given that the lipase from genus *Burkholderia* genus are known to be non-specific whereas those from the *Rhizopus* genus are generally *sn*-1,3-specific. Various studies suggested that the use of mixtures of regioselectives and non-specific lipases is favorable. This is the case of the use of the lipases from *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* co-immobilized on silica-gel to catalyse the methanolysis of soybean oil in PBR, which produced a conversion of 99% in 3 h [26], higher than the obtained separately with *R. oryzae* (70% in 18 h) and *C. rugosa* (20% in 30 h) [25]. In addition, Poppe et al. [46] used a mixture of three immobilized commercial lipases (from *C. Antarctica*, CALB or Novozyme 435, *T. lanuginosus*, Lipozyme TL-IM and *Rhizomucor miehei*, Lipozyme RM-IM) and reported 95% conversion for the olive oil with the three lipases mixed (compared to 50% for the best individual lipase, CALB). For palm oil, the best mixture was when only *sn*-1,3-specific lipases (TL-IM e RM-IM) were used, with 80% conversion, as compared to only 44% when TL-IM was used alone.

In our case, in shake flasks, we had only a slight effect using different mixtures of BCFS and RMFS when the reaction was performed with ethanol addition at 12 h. The best results were obtained with ratios 1:1 and 1:3 of RMFS:BCFS, which gave higher conversions of 72% and 73% than that obtained when BCFS was used alone (67%) (**Fig. 3A**). However, with ethanol addition at 6 h, where BCFS isolated is more efficient (79.3%), only the mixture 1:3 reached the same conversion (79.9%), but with a lower reaction rate. In this case, the synergistic effect was not observed, probably due to the lower stability and higher inhibition of RMFS caused by early ethanol additions (**Fig. 3**). This loss of stability and ethanol inhibition of RMFS is in agreement with the results of Zago et al. [14], for the ethanolysis of corn oil. They reported that the residual activities of RMFS decreased over the course of the reaction, with the

greatest decrease (lower than 65% residual activity, after 72 h) occurring at molar ratios higher than 3:1.

The alcohol stepwise addition during the course of enzymatic transesterification of oils is the most frequently used strategy to prevent the inactivation of lipases by the excess of the alcohol in the reaction medium [1,8]. However, there are lipases of microorganism more tolerant to alcohol than others. Shrimhan et al [43] used the lipases of *R. mucilagenosa* P11I89 as whole cell and studied the stepwise addition of methanol. The authors concluded that methanol stepwise addition was not necessary due to methanol tolerant property of the microorganism, which could be active with up to 6 mole-eq. BCFS was more tolerant to 1.5 mole-eq. of ethanol than RMFS, and even up to 2.5 mole-eq. BCFS showed good tolerance because the initial reaction rate was smaller decline than with RMFS (**Fig 2B**).

In the case of the use of fermented solids based on sugarcane bagasse, a problem detected by Soares et al. (2015) is that, being the sugarcane bagasse hydrophilic, it retains ethanol, rendering the ratio ethanol:oil in the microenvironment higher than that in the bulk medium. They observed that around 20-25% of the total mass of the reaction medium was sorbed on the fermented solid in 12 h, and of this, 25-30% was ethanol.

In fact, other compounds produced during the reaction are also adsorbed by the fermented solid. The main one is glycerol, that can cause mass transfer problems by forming a hydrophilic film on the immobilized enzyme, decreasing the rate of the reaction and eventually causing it to stop [46,52,53]. The barrier formed on the support not only limits the internal diffusion of products and hydrophobic substrates, but also increases the diffusion and accumulation of the alcohol on the microenvironment of the biocatalyst, inactivating it, by

Table 4. Studies of biodiesel production by transesterification of palm oil with lipases in solvent-free medium

Lipase	Support	Molar ratio	Solvent	Reactor / Temperature	Conversion / Time	Reuse cycles / Washing	
<i>Burkholderia contaminans</i>	SCB	Ethanol / PO 5:1	Free	SF, 50 °C PBR, 50/44 °C	88% / 48 h 89% / 30 h	nd 5 (74% R) / <i>n</i> -hexane + <i>tert</i> -butanol	This work
<i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	Whole cell	Methanol / PO 6:1	Free (10% water)	SF, 30 °C	83% / 72 h	2 (71% R) / none	[43]
<i>Aspergillus niger</i>	BSP in SmF + GA	Methanol / PO 3:1	Free (15% water)	PBR, 40 °C	90% / 72 h	4 (94% R) / none	[44]
<i>Aspergillus oryzae</i> (recombinant)	BSP	Methanol / PO 4:1	Free (5% water)	SF, 40 °C	99% / 96 h	nd	[50]
Lipase AK	POS-PVA + GA	Ethanol / PO 18:1	Free	SF, 40 °C	98% / 72 h	5 (65% A, 24 h every) / <i>n</i> -hexane	[40]
Lipase PS					75% / 72 h		
Lipase AY 50% and Lipase AK 50%	Accurel EP-100	Ethanol / PO 3:1	Free (2% water)	SF, 45 °C PBR, 45 °C	91% / 6 h 67% / 8 h	15 (50% A) / none nd	[47]
Novozym 435	Resin	Methanol / PO 3.2:1	Free	SF, 60 °C	97% / 35 h	4 (82% R) / none	[42]
Novozym 435	Resin	Methanol / MA/ PO 1:12:1	Free	SF, 50 °C	95% / 8 h	10 (90% A) / MA	[48]
Lipase AK	POS-PVA	Methanol / PO 9:1	Free	PBR, 50 °C	62%	240 h continuous	[49]
Lipase AK	POS-PVA	Methanol / PO 8:1	Free	SF, 43 °C (micro-wave)	77% / 12 h	nd	[51]
Lipozyme TL-IM 53% and Lipozyme RM-IM 47%	Resin	Methanol / PO 9:1	Free	SF, 40 °C	80% / 18 h	7 (80% A) / <i>n</i> -hexane	[46]

POS-PVA: polysiloxane – poly(vinyl) alcohol. GA: glutaraldehyde. BSP: biomass support particles, SmF: submerged fermentation, SCB: sugarcane bagasse, PO: palm oil. MA: methyl acetate. R: relative conversion. A: residual activity. nd: not determined

decrease of thermodynamic water activity of the lipase from its optimum value and consequently, decreasing the reaction efficiency gradually [53,54].

In both experiments of reactions in two stages, it is considered that most of the glycerol produced was removed from the system after the first stage, both by washing with *tert*-butanol in the same solid (**Fig. 5**), or with the exchange of fermented solids (**Fig. 6**). This strategy increased the conversions for the second stages. Nevertheless, none of these strategies of reactions in two stages were successful, given that the obtained conversions in STR were not higher than 88.4%. These results suggest that the reaction might have reached a maximum plateau of equilibrium around this value, because, otherwise, the reaction would have proceeded, given that there was no limitation of the diffusion of substrates caused by glycerol.

Due to the fact that the reactions reached a plateau, beyond using ethanol stepwise addition, we tried other strategies in order to prevent the enzyme inactivation and the mass transfer limitations for an appropriated reuse of the solid. The experiments of washing of solids after reaction in SF (**Fig 4**) showed that, in the first cycle, the conversion was recovered up to 91% of the original conversion when a double sequential washings were made, first with *n*-hexane and then with *tert*-butanol. Without any washing, products and by-products totally limited the relative conversion to only 20% in a second cycle. Consequently, this strategy was used between cycles of reactions in PBR and the relative conversion decrease slowly until 74% at the fifth cycle. We considered that our ethanolysis reaction with the fermented solids in free-solvent system, together with the strategy of sequential washings of the solid is quite promising. This strategy could be advantageous in an industrial process, because it can potentially give a purer biodiesel (with low glycerol levels), which could be recovered after

each cycle of reaction, and the solvents used in the washes could be easily recovered by using a rotary evaporator. Our results are better than the result reported by Liu et al. [16], which used fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* for the ethanolysis reaction of soybean oil using *tert*-butanol as solvent (40% in relation to oil). The authors increased the conversion from 86% to 50% in the third cycle (58% relative conversion), even with a 96 h in each cycle.

The alternative strategy of washing only with *n*-hexane showed that the glycerol accumulated in the solid is not the only cause of the loss of activity of the solid, since for 5 reaction cycles with glycerol accumulation the relative conversions decrease to 37%. When glycerol was removed with a washing of *tert*-butanol, the relative conversion increase to 70% in a fifth cycle, which is similar to the conversion obtained in the same cycle when double washings were made. These results are in agreement with those reported by Chen and Wu [55], who showed that the washings with *tert*-butanol and 2-butanol helped restore respectively 75 and 56% of the enzyme activity lost during several reaction cycles. Beyond this, the accumulation of glycerol on the fermented solid would render its recovery easier at the end of the process, by single *tert*-butanol washing. Our fermented solid of *B. contaminans* achieved similar reuse cycles to those obtained with commercial lipases and washing with *n*-hexane between cycles, by example, Moreira et al. [40] achieved 5 reuse cycles with the Lipase AK, decreasing its activity at 65% of the initial, and Poppe et al. [46] with the mixture of Lipozyme TL-IM and Lipozyme RM-IM obtained 7 reuse cycles up to 80% of residual activity.

4.5 Conclusions

In this work, we demonstrated that the fermented solid produced by *Burkholderia contaminans* LTEB11 is quite effective as a catalyst for the ethanolysis of palm oil, in a

solvent-free system. The highest conversion (89% in 30 h) was obtained in a packed bed reactor, in a molar::ratio of 5.5 to 1 (ethanol to palm oil), with ethanol stepwise addition. The sequential washings of the fermented solid with *n*-hexane and *tert*-butanol allowed the reuse of the biocatalyst for 5 cycles, with 79% of relative conversion. These results are quite promising and foster future studies on scaling up of the transesterification process.

Acknowledgments

This work was supported financially by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), in the form of a “Universal” research grant and research scholarships granted to David Mitchell and Nadia Krieger. We also thank the Coordination for the Development of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) and the Organization of American States (OAS) together with the Coimbra Group of Brazilian Universities (CGBU) for the academic scholarship granted to Jonathan Galeano.

References

- [1] Christopher LP, Hemanathan K, Zambare VP. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Appl Energy* 2014;119:497–520.
- [2] Kuss V V, Kuss A V, Rosa RG, Aranda DAG, Cruz YR. Potential of biodiesel production from palm oil at Brazilian Amazon. *Renew Sustain Energy Rev* 2015;50:1013–20.
- [3] Leung DYC, Wu X, Leung MKH. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Appl Energy* 2010;87:1083–95.
- [4] ABRAPALMA. Associação Brasileira de Produtores de Óleo de Palma. 2015. <http://www.abrapalma.org/pt/>.
- [5] Gog A, Roman M, Tos M, Paizs C, Dan F. Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives. *Renew Energy* 2012;39:10–6.
- [6] Fjerbaek L, Christensen K V., Norddahl B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnol Bioeng* 2009;102:1298–315.
- [7] Marty A, Dossat V, Condoret JS. Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: Influence of the production of hydrophilic compounds. *Biotechnol Bioeng* 1997;56:232–7.
- [8] Shimada Y, Watanabe Y, Samukawa T, Sugihara A, Noda H, Fukuda H, et al. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J Am Oil Chem*

Soc 1999;76:789–93.

- [9] Hama S, Tamalampudi S, Fukumizu T, Miura K, Yamaji H, Kondo A, et al. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. *J Biosci Bioeng* 2006;101:328–33.
- [10] Talukder MMR, Lee HZS, Low RF, Pei-Lyn LC, Warzecha D, Wu J. Potential use of whole cell lipase from a newly isolated *Aspergillus nomius* for methanolysis of palm oil to biodiesel. *J Mol Catal B Enzym* 2013;89:108–13.
- [11] Ban K, Kaieda M, Matsumoto T, Kondo A, Fukuda H. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochem Eng J* 2001;8:39–43.
- [12] Fernandes MLM, Saad EB, Meira J a., Ramos LP, Mitchell DA, Krieger N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. *J Mol Catal B Enzym* 2007;44:8–13.
- [13] Salum TFC, Villeneuve P, Barea B, Yamamoto CI, Côcco LC, Mitchell DA, et al. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. *Process Biochem* 2010;45:1348–54.
- [14] Zago E, Botton V, Alberton D, Córdova J, Yamamoto CI, Côcco LC, et al. Synthesis of ethylic esters for biodiesel purposes using lipases naturally immobilized in a fermented solid produced using *Rhizopus microsporus*. *Energy & Fuels* 2014;28:5197–203.
- [15] Soares D, Pinto AF, Gonçalves AG, Mitchell DA, Krieger N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. *Biochem Eng J* 2013;81:15–23.
- [16] Liu Y, Li C, Meng X, Yan Y. Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation. *Fuel Process Technol* 2013;106:303–9.
- [17] Diaz JCM, Rodríguez JA, Roussos S, Cordova J, Abousalham A, Carriere F, et al. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme Microb Technol* 2006;39:1042–50.
- [18] Cordova J, Nemmaoui M, Morin A, Roussos S, Raimbault M, Benjilali B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *J Mol Catal B Enzym* 1998;5:75–8.
- [19] Rodriguez JA, Mateos JC, Nungaray J, González V, Bhagnagar T, Roussos S, et al. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochem* 2006;41:2264–9.
- [20] Liu Y, Li C, Wang S, Chen W. Solid-supported microorganism of *Burkholderia cenocepacia* cultured via solid state fermentation for biodiesel production : Optimization and kinetics. *Appl Energy* 2014;113:713–21.
- [21] Aguiéiras ECG, Cavalcanti-oliveira E, Castro AM, Langone MA, Freire DMG. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme /enzyme) hydroesterification process : Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. *Fuel* 2014;135:315–21.
- [22] Matori M, Asahara T, Ota Y. Positional specificity of microbial lipases. *J Ferment Bioeng* 1991;72:397–8.

- [23] Okumura S, Iwai M, Tsujisaka Y. Positional specificities of four kinds of microbial lipases. *Agric Biol Chem* 1976;40:655–60.
- [24] Stadler P, Kovac A, Haalck L, Spener F, Paltauf F. Stereoselectivity of microbial lipases The substitution at position sn-2 of triacylglycerol analogs influences the stereoselectivity of different microbial lipases. *Eur J Biochem* 1995;343:335–43.
- [25] Lee DH, Kim JM, Shin HY, Kang SW, Kim SW. Biodiesel production using a mixture of immobilized *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* lipases. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2006;11:522–5.
- [26] Lee JH, Kim SB, Yoo HY, Lee JH, Han SO, Park C, et al. Co-immobilization of *Candida rugosa* and *Rhyzopus oryzae* lipases and biodiesel production. *Korean J Chem Eng* 2013;30:1335–8.
- [27] Alberton D, Mitchell DA, Krieger N. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. *Food Technol Biotechnol* 2010;48:28–35.
- [28] Tiss A, Carrière F, Verger R. Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity. *Anal Biochem* 2001;294:36–43.
- [29] Lowry RR, Tinsley IJ. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J Am Oil Chem Soc* 1976;53:470–2.
- [30] Halim SFA, Kamaruddin AH, Fernando WJN. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. *Bioresour Technol* 2009;100:710–6.
- [31] European Committee for Standardization. EN 14103: determination of ester and linolenic acid methyl ester contents, English version; 2011.
- [32] Hartman L, Lago R. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. 1973.
- [33] Li L, Du W, Liu D, Wang L, Li Z. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. *J Mol Catal B Enzym* 2006;43:58–62.
- [34] AOCS Official Methods and Recommended Practices, Ca 5a–40, 4th ed. 1989.
- [35] AOCS Official Methods and Recommended Practices, Ca 2e–84, 4th ed. 1997.
- [36] AOCS Official Methods and Recommended Practices, Cd 3-25, 4th ed. 1990.
- [37] Kapoor M, Gupta MN. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem* 2012;47:555–69.
- [38] Li W, Li RW, Li Q, Du W, Liu D. Acyl migration and kinetics study of 1(3)-positional specific lipase of *Rhizopus oryzae*-catalyzed methanolysis of triglyceride for biodiesel production. *Process Biochem* 2010;45:1888–93.
- [39] Tran D, Lin Y, Chen C, Chang J. Kinetics of transesterification of olive oil with methanol catalyzed by immobilized lipase derived from an isolated *Burkholderia* sp. strain. *Bioresour Technol* 2013;145:193–203.
- [40] Moreira ABR, Perez VH, Zanin GM, De Castro HF. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. *Energy and Fuels* 2007;21:3689–94.
- [41] RFA. Renewable Fuels Association. World Fuel Ethanol Production. 2014. <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/>.
- [42] Talukder MMR, Beatrice KLM, Song OP, Puah S, Wu JC, Won CJ, et al. Improved method

- for efficient production of biodiesel from palm oil. *Energy* 2008;22:141–4.
- [43] Srimhan P, Kongnum K, Taweerdjanakarn S, Hongpattarakere T. Enzyme and Microbial Technology Selection of lipase producing yeasts for methanol-tolerant biocatalyst as whole cell application for palm-oil transesterification. *Enzyme Microb Technol* 2011;48:293–8.
 - [44] Xiao M, Qi C, Obbard JP. Biodiesel production using *Aspergillus niger* as a whole-cell biocatalyst in a packed-bed reactor. *GCB Bioenergy* 2011;3:293–8.
 - [45] Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, Brandt E De, Lipuma JJ, et al. Taxon K, a complex within the Burkholderia cepacia complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:102–11.
 - [46] Poppe JK, Matte CR, Peralba M, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, Ayub MA, et al. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. *Appl Catal A, Gen* 2015;490:50–6.
 - [47] Tongboriboon K, Cheirsilp B, H-Kittikun A. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. *J Mol Catal B Enzym* 2010;67:52–9.
 - [48] Talukder MMR, Das P, Fang TS, Wu JC. Enhanced enzymatic transesterification of palm oil to biodiesel. *Biochem Eng J* 2011;55:119–22.
 - [49] Dors G, Freitas L, Mendes A, Furigo A, De Castro H. Transesterification of palm oil catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* lipase in a packed-bed reactor. *Energy and Fuels* 2012;26:5977–82.
 - [50] Adachi D, Koda R, Hama S, Yamada R, Nakashima K, Ogino C, et al. An integrative process model of enzymatic biodiesel production through ethanol fermentation of brown rice followed by lipase-catalyzed ethanolysis in a water-containing system. *Enzyme Microb Technol* 2013;52:118–22.
 - [51] Rós PCM, Freitas L, Perez VH, de Castro HF. Enzymatic synthesis of biodiesel from palm oil assisted by microwave irradiation. *Bioprocess Biosyst Eng* 2013;36:443–51.
 - [52] Akoh CC, Chang S, Lee G, Shaw J. Enzymatic approach to biodiesel production. *J Agric Food Chem* 2007;55:8995–9005.
 - [53] Dossat V, Combes D, Marty A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor : influence of the glycerol production. *Enzyme Microb Technol* 1999;25:194–200.
 - [54] Watanabe Y, Shimada Y, Sugihara A, Noda H. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J Am Oil Chem Soc* 2000;77:355–60.
 - [55] Chen J-W, Wu W-T. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. *J Biosci Bioeng* 2003;95:466–9.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, demonstrou-se que o sólido fermentado produzido por *Burkholderia contaminans* LTEB11 (BCFS) é mais eficaz como biocatalisador para a etanolise do óleo de palma, em sistema livre de solvente, quando comparado com o sólido fermentado produzido por *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (RMFS).

As maiores conversões foram atingidas em frascos agitados, com 8% de sólido fermentado (com relação ao óleo de palma) em 48 h, razão molar etanol:óleo 4,5:1 e com adição de etanol em 3 etapas. Obteve-se 50% com RMFS e 88% com BCFS. Quando a reação foi realizada no reator de leito empacotado com 12% BCFS, na razão molar 5,5:1, com adição de etanol em 4 etapas obteve-se um valor similar de conversão (89%), mas em um tempo muito mais curto (30 h).

Foram padronizadas as condições da produção de lipases por FES para ambos os micro-organismos, utilizando como substrato o bagaço de cana umedecido com solução nutriente e óleo de soja. As atividades de hidrólise produzidas estiveram na mesma faixa, sendo 171 U g⁻¹SS para o RMFS e 160 U g⁻¹SS para BCFS. No entanto, as diferenças nas atividades de esterificação se mantiveram, sendo a do RMFS 2,3 vezes maiores que a do BCFS.

As cinéticas da reação em frascos agitados, feitas em razões molares etanol:óleo de 3:1 e 4,5:1 com adições de etanol em várias etapas mostraram que BCFS é menos inibido e desativado pelo etanol em comparação a RMFS.

O fato de que o glicerol também foi produzido quando foi utilizado RMFS sugere que uma provável migração do grupo acila *sn*-2 do diacilglicerídeo está ocorrendo. Durante a reação, a produção de glicerol por BCFS foi maior que a do RMFS, o que é resultado da sua maior conversão em ésteres obtida quando BCFS foi usado.

Houve um efeito sinérgico mínimo quando misturados RMFS e BCFS na relação 1:3. Mesmo assim, esta mistura não produziu conversões superiores em relação às obtidas quando BCFS foi utilizado sozinho.

As reações realizadas em duas etapas, tanto com a remoção do glicerol retido no sólido, como com a troca do primeiro sólido por um novo mostraram incrementos da conversão nas segundas etapas. Porém, a máxima conversão não ultrapassou a média de 90%.

As duplas lavagens sequenciais com *n*-hexano e *tert*-butanol foram a melhor opção para recuperar a eficiência dos sólidos e permitir assim, no caso do BCFS, em reator de leito empacotado, um reuso de 5 ciclos de reação, com 74% de conversão relativa.

Os resultados apresentados neste trabalho são promissores e abrem caminho ao planejamento e à otimização de novas possíveis estratégias de transesterificação com sólidos fermentados.

6. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho abrem novas perspectivas de trabalho, sugerindo-se as seguintes possibilidades para a continuação deste projeto:

- Calcular as conversões de equilíbrio teóricas para as condições otimizadas no presente trabalho para explicar os resultados de máxima conversão de 90%.
- Encontrar maneiras de deslocar o equilíbrio da reação, via condições de processo, para aumentar as conversões.
- Aumentar mais a escala do processo de transesterificação em PBR utilizando óleo de palma.
- Otimizar novas estratégias de fermentação em estado sólido utilizando óleo de palma ao invés de óleo de soja como indutor da produção de lipases.
- Investigar a estabilidade, atividade e o desempenho de sólidos fermentados tratados com glutaraldeído e polietilenimina (ver material suplementar, pag. 97) em reações de transesterificação.
- Reaproveitar os sólidos fermentados utilizados em reações de transesterificação como substrato de fermentação em estado sólido.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAPALMA (Associação Brasileira de Produtores de Óleo de Palma). Disponível em: <<http://www.abrapalma.org/pt/>>. Acesso em 17/04/2015. .

ADACHI, D.; KODA, R.; HAMA, S.; et al. An integrative process model of enzymatic biodiesel production through ethanol fermentation of brown rice followed by lipase-catalyzed ethanolysis in a water-containing system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 2, p. 118–122, 2013.

AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E.; CASTRO, A. M.; LANGONE, M. A.; FREIRE, D. M. G. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme /enzyme) hydroesterification process : Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315–321, 2014.

AKOH, C. C.; CHANG, S.; LEE, G.; SHAW, J. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8995–9005, 2007.

ALI, Y.; HANNA, M. A.; LEVITICUS, L. I. Emissions and power characteristic of diesel engines on methyl soyate and diesel fuel blends. **Bioresource Technology**, v. 52, p. 185–195, 1995.

AL-ZUHAIIR, S.; WEI, F.; SONG, L. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 951–960, 2007.

ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis). Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em 10/03/2015. .

BAN, K.; HAMA, S.; NISHIZUKA, K.; et al. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, n. 3-5, p. 157–165, 2002.

BAN, K.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, n. 1, p. 39–43, 2001.

BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. The slow-down of the CALB immobilization rate permits to control the inter and intra molecular modification produced by glutaraldehyde. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 766–774, 2012a.

BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1220–1227, 2012b.

BENJUMEA, P.; AGUDELO, J. Basic properties of palm oil biodiesel – diesel blends. **Fuel**, v. 87, p. 2069–2075, 2008.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases : classification , properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 73–81, 2002.

BOTTON, V. Síntese enzimática de monoésteres etílicos (biodiesel) catalisada por sólido fermentado contendo atividade lipolítica. Tese (Doutorado em Química) - Departamento

de Química. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2014..

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

CHRISTOPHER, L. P.; HEMANATHAN, K.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497–520, 2014.

CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; MORIN, A.; et al. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, p. 75–78, 1998.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291–302, 2006.

D'SOUZA, S. F.; KUBAL, B. S. A cloth strip bioreactor with immobilized glucoamylase. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 51, n. 2, p. 151–159, 2002.

DIAS, G. S. **Aumento de escala da produção de ésteres etílicos em reatores de leito fixo com sólido fermentado de Burkholderia lata CPQBA 515-12 DRM 01**, 2015. Universidade Federal do Paraná.

DORS, G.; FREITAS, L.; MENDES, A.; FURIGO, A.; CASTRO, H. DE. Transesterification of palm oil catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* lipase in a packed-bed reactor. **Energy and Fuels**, v. 26, p. 5977–5982, 2012.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor : influence of the glycerol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 194–200, 1999.

DU, W.; XU, Y.; LIU, D.; ZENG, J. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 3-4, p. 125–129, 2004.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; et al. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, n. 1, p. 8–13, 2007.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; MATEO, C.; et al. Glutaraldehyde cross-linking of lipases adsorbed on aminated supports in the presence of detergents leads to improved performance. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 9, p. 2610–2615, 2006.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1298–1315, 2009.

FUKUDA, H.; KOND, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 405–416, 2001.

GOG, A.; ROMAN, M.; TOS, M.; PAIZS, C.; DAN, F. Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives. **Renewable Energy**, v. 39, p. 10–16, 2012.

HALIM, S. F. A.; KAMARUDDIN, A. H.; FERNANDO, W. J. N. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 710–716, 2009.

HAMA, S.; KONDO, A. Enzymatic biodiesel production: An overview of potential feedstocks and process development. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 386–395, 2013. Elsevier Ltd.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; FUKUMIZU, T.; et al. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support sarticles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 4, p. 328–333, 2006.

HWANG, S.; LEE, K. T.; PARK, J. W.; et al. Stability analysis of *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase immobilized on surface-modified silica gels. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, n. 2, p. 85–90, 2004.

JAEGER, K.-E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315–351, 1999.

JAEGER, K.-E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 29–63, 1994.

JAEGER, K.-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. September, p. 396–403, 1998.

JENNESSEN, J.; SCHNURER, J.; OLSSON, J.; SAMSON, R. A.; DIJKSTERHUIS, J. Morphological characteristics of sporangiospores of the tempe fungus *Rhizopus oligosporus* differentiate it from other taxa of the *R. microsporus* group. **Mycological Research**, v. 112, p. 547–563, 2008.

JIN, Z.; HAN, S. Y.; ZHANG, L.; et al. Combined utilization of lipase-displaying *Pichia pastoris* whole-cell biocatalysts to improve biodiesel production in co-solvent media. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 102–109, 2013.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; MATSUMOTO, T.; et al. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 6, p. 627–631, 1999.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.

KILINÇ, A.; TEKE, M.; ONAL, S.; TELEFONCU, A. Immobilization of pancreatic lipase on chitin and chitosan. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 153–163, 2006.

KUSS, V. V; KUSS, A. V; ROSA, R. G.; ARANDA, D. A. G.; CRUZ, Y. R. Potential of biodiesel production from palm oil at Brazilian Amazon. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 1013–1020, 2015.

LEE, D. H.; JUNG, M. K.; SHIN, H. Y.; KIM, S. W. Optimization of lipase pretreatment prior to lipase immobilization to prevent loss of activity. **Journal of Microbiology and**

Biotechnology, v. 17, p. 650–654, 2007.

LEE, D. H.; KIM, J. M.; KANG, S. W.; LEE, J. W.; KIM, S. W. Pretreatment of lipase with soybean oil before immobilization to prevent loss of activity. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 1965–1969, 2006.

LEE, D. H.; KIM, J. M.; SHIN, H. Y.; KANG, S. W.; KIM, S. W. Biodiesel production using a mixture of immobilized *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* lipases. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 11, p. 522–525, 2006.

LEE, J. H.; KIM, S. B.; YOO, H. Y.; et al. Co-immobilization of *Candida rugosa* and *Rhizopus oryzae* lipases and biodiesel production. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 6, p. 1335–1338, 2013.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, n. 4, p. 1083–1095, 2010.

LI, L.; DU, W.; LIU, D.; WANG, L.; LI, Z. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 58–62, 2006.

LI, W.; LI, R. W.; LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Acyl migration and kinetics study of 1(3)-positional specific lipase of *Rhizopus oryzae*-catalyzed methanolysis of triglyceride for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 12, p. 1888–1893, 2010.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; et al. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, n. 1-3, p. 53–61, 2004.

LIU, Y.; LI, C.; MENG, X.; YAN, Y. Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation. **Fuel Processing Technology**, v. 106, p. 303–309, 2013.

LIU, Y.; LI, C.; WANG, S.; CHEN, W. Solid-supported microorganism of *Burkholderia cenocepacia* cultured via solid state fermentation for biodiesel production : Optimization and kinetics. **Applied Energy**, v. 113, p. 713–721, 2014.

LOURINHO, G.; BRITO, P. Advanced biodiesel production technologies : novel developments. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, p. 287–316, 2015.

MA, F.; HANNA, M. Biodiesel production : a review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1–15, 1999.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL, C. G.; AMUNDSONT, C. H. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 426–446, 1992.

MARTY, A.; DOSSAT, V.; CONDORET, J. S. Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: Influence of the production of hydrophilic compounds. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, n. 2, p. 232–237, 1997.

MATORI, M.; ASAHARA, T.; OTA, Y. Positional specificity of microbial lipases. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 72, n. 5, p. 397–398, 1991.

MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C. Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, n. 5, p. 790–802, 2004.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M.. **Solid-State Fermentation Bioreactor Fundamentals: Introduction and Overview**. In: Solid-State Fermentation Bioreactors. Heidelberg: Springer. 2006

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. **The bioreactor step of SSF: A complex interaction of phenomena**. In: MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Springer, p. 13-32, Heidelberg, 2006

MOREIRA, A. B. R.; PEREZ, V. H.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. DE. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. **Energy and Fuels**, v. 21, n. 6, p. 3689–3694, 2007.

NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 8, p. 692–700, 2008.

ODA, M.; KAIEDA, M.; HAMA, S.; et al. Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 1, p. 45–51, 2005.

OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. Positional specificities of four kinds of microbial lipases. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 655–660, 1976.

OLLIS, D. L.; SHEA, E.; CYGLER, M.; et al. The α/β hydrolase fold. **Protein Engineering**, v. 5, p. 197–211, 1992.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 3-5, p. 187–204, 2000.

PALOMO, J. M.; SEGURA, R. L.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Glutaraldehyde modification of lipases adsorbed on aminated supports: A simple way to improve their behaviour as enantioselective biocatalyst. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 704–707, 2007.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81–84, 2003.

POPPE, J. K.; MATTE, C. R.; PERALBA, M.; et al. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. **Applied Catalysis A, General**, v. 490, p. 50–56, 2015.

QIN, H. E.; YAN, X. U.; YUN, T.; DONG, W. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 29, n. 1, p. 41–46, 2008.

RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 682–688, 2011.

RODRIGUEZ, J. A.; MATEOS, J. C.; NUNGARAY, J.; et al. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2264–2269, 2006.

RÓS, P. C. M.; FREITAS, L.; PEREZ, V. H.; CASTRO, H. F. DE. Enzymatic synthesis of biodiesel from palm oil assisted by microwave irradiation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 4, p. 443–451, 2013.

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 648–653, 2007.

SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; et al. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1348–1354, 2010.

SAXENA, R. K.; GHOSH, P. K.; GUPTA, R.; et al. Microbial lipases. Potencial biocatalyst for the future industry. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 101–115, 1999.

SCHRAG, J. D.; LI, Y.; CYGLER, M.; et al. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure**, v. 5, n. 2, p. 187–202, 1997.

SCHUMACHER, L. G.; BORGELT, S. C.; FOSSEEN, D.; GOETZ, W.; HIRES, W. G. Heavy-duty engine exhaust emission tests using methyl ester soybean oil/diesel fuel blends. **Biomacromolecules**, v. 57, p. 31–36, 1996.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; et al. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, p. 789–793, 1999.

SIM, J. H.; KAMARUDDIN, A. H.; BHATIA, S. Biodiesel (FAME) productivity, catalytic efficiency and thermal stability of lipozyme TL im for crude palm oil transesterification with methanol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 9, p. 1027–1034, 2010.

SINGH, S. P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 200–216, 2010.

SOARES, D.; DACI, J. D.; CORAZAA, M. L.; et al. Analysis of multiphasic behavior during the ethyl esterification of fatty acids catalyzed by a fermented solid with lipolytic activity in a packed-bed bioreactor in a closed-loop batch system. **Fuel**, v. 159, p. 364–372, 2015.

SOARES, D.; PINTO, A. F.; GONÇALVES, A. G.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 15–23, 2013.

SRIMHAN, P.; KONGNUM, K.; TAWEERODJANAKARN, S.; HONGPATTARAKERE, T. Enzyme and Microbial Technology Selection of lipase producing yeasts for methanol-tolerant biocatalyst as whole cell application for palm-oil transesterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 3, p. 293–298, 2011.

STADLER, P.; KOVAC, A.; HAALCK, L.; SPENER, F.; PALTAUF, F. Stereoselectivity of microbial lipases The substitution at position sn-2 of triacylglycerol analogs influences the

stereoselectivity of different microbial lipases. **European Journal of Biochemistry**, v. 343, p. 335–343, 1995.

STEVENSON, D. E.; STANLEY, R. A.; FURNEAUX, R. H. Near-quantitative production of fatty acid alkyl esters by lipase-catalyzed alcoholysis of fats and oils with adsorption of glycerol by silica gel. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 478–484, 1994.

SUN, S. Y.; XU, Y. Membrane-bound synthetic lipase specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1336–1342, 2009.

SUN, T.; DU, W.; LIU, D.; DAI, L. Improved catalytic performance of GA cross-linking treated *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1192–1195, 2010.

TALUKDER, M. M. R.; BEATRICE, K. L. M.; SONG, O. P.; et al. Improved method for efficient production of biodiesel from palm oil. **Energy**, v. 22, n. 1, p. 141–144, 2008.

TALUKDER, M. M. R.; DAS, P.; FANG, T. S.; WU, J. C. Enhanced enzymatic transesterification of palm oil to biodiesel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, n. 2, p. 119–122, 2011.

TALUKDER, M. M. R.; LEE, H. Z. S.; LOW, R. F.; et al. Potential use of whole cell lipase from a newly isolated *Aspergillus nomius* for methanolysis of palm oil to biodiesel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 108–113, 2013.

TALUKDER, M. R.; WU, J. C.; FEN, N. M.; LI, Y.; MELISSA, S. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 2, p. 207–212, 2010.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 5, p. 628–634, 2010.

TONGBORIBOON, K.; CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 1-2, p. 52–59, 2010.

TRAN, D.; LIN, Y.; CHEN, C.; CHANG, J. Kinetics of transesterification of olive oil with methanol catalyzed by immobilized lipase derived from an isolated *Burkholderia* sp. strain. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 193–203, 2013.

TRAN, D. N.; BALKUS, K. J. Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. **ACS Catalysis**, v. 1, n. 8, p. 956–968, 2011.

VANLAERE, E.; BALDWIN, A.; GEVERS, D.; et al. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 102–111, 2009.

VÉRAS, I. C.; SILVA, F. A L.; FERRÃO-GONZALES, A. D.; MOREAU, V. H. One-step enzymatic production of fatty acid ethyl ester from high-acidity waste feedstocks in solvent-free media. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9653–9658, 2011.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends in**

Biotechnology, v. 15, n. 1989, p. 32–38, 1997.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NODA, H. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 77, n. 4, p. 355–360, 2000.

XIAO, M.; QI, C.; OBBARD, J. P. Biodiesel production using *Aspergillus niger* as a whole-cell biocatalyst in a packed-bed reactor. **GCB Bioenergy**, v. 3, p. 293–298, 2011.

XU, Y.; DU, W.; LIU, D.; ZENG, J. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1239–1241, 2003.

YÜCEL, Y. Biodiesel production from pomace oil by using lipase immobilized onto olive pomace. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3977–3980, 2011.

ZAGO, E.; BOTTON, V.; ALBERTON, D.; et al. Synthesis of ethylic esters for biodiesel purposes using lipases naturally immobilized in a fermented solid produced using *Rhizopus microsporus*. **Energy & Fuels**, v. 28, n. 8, p. 5197–5203, 2014.

ZAGO, E. C. Síntese de ésteres etílicos empregando lipases de *Rhizopus microsporus* produzidas por fermentação no estado sólido. 127p. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2010.

ZOU, B.; SONG, C.; XU, X.; et al. Enhancing stabilities of lipase by enzyme aggregate coating immobilized onto ionic liquid modified mesoporous materials. **Applied Surface Science**, v. 311, p. 62–67, 2014.

8. MATERIAL SUPLEMENTAR

8.1 ESTUDOS PRELIMINARES DE IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES E CÉLULAS INTEIRAS NOS SÓLIDOS FERMENTADOS

O tratamento com glutaraldeído (GA) como agente promotor de ligações cruzadas covalentes entre as lipases ou células inteiras e o suporte têm sido estudado visando melhorar a estabilidade dos biocatalisadores. Vários tipos de suporte foram utilizados com esta estratégia, como por exemplo, quitina, quitosana, espuma de poliuretano, sílica gel e bagaço de azeitona (BAN et al., 2002; HWANG et al., 2004; ODA et al., 2005; KILINÇ et al., 2006; SUN et al., 2010; YÜCEL, 2011). Neste tratamento, espera-se a formação de bases de Schiff através de ataques nucleofílicos principalmente de grupos ϵ -amino de resíduos de lisina na enzima (MIGNEAULT et al., 2004).

Por outro lado, foram relatadas estratégias que acrescentaram uma adição de polietilenimina (PEI) (pré- ou pós-imobilização por adsorção) para revestir o suporte (sem grupamentos amino) antes do tratamento com GA, obtendo-se resultados promissores na ligação e imobilização de variedades de enzimas e células. Alguns suportes utilizados foram, por exemplo, tecidos de algodão (celulose) (D'SOUZA; KUBAL, 2002), sílica gel (HWANG et al., 2004) e agarose (PALOMO et al., 2007).

Além disso, para evitar a perda de atividade das lipases durante os entrecruzamentos, sugere-se fazer uma pré-incubação das lipases com substratos como óleo de soja (LEE et al., 2006; LEE et al., 2007) ou com detergentes não iônicos (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2006) antes do tratamento com GA, para proteger a lipase de possíveis ligações covalentes no sítio ativo e estabilizar a forma aberta ou ativa da enzima (ver seção 2.2.2).

As ligações do GA com diferentes alvos vão depender da reatividade dos grupos funcionais envolvidos nas reações, como amino primário (por exemplo, ϵ -amino) e amino secundário, que podem levar à formação de ligações estáveis tipo imina (base de Schiff) e enamina, respectivamente, ou com grupos hidroxila que forma ligações tipo hemiacetal, as quais são reversíveis e pouco estáveis. Com base nisto,

foi proposta a avaliação preliminar das estratégias anteriores com os sólidos fermentados. Desta forma, considerando os principais componentes que estariam presentes e poderiam reagir durante os tratamentos propostos aos sólidos, existe uma serie de possibilidades de ligações cruzadas mediadas por GA, entre lipases, quitina (parede celular das células inteiras), celulose, hemicelulose e/ou lignina (bagaço de cana), e PEI (FIGURA 10), cuja eficiência da reação, além da reatividade dos grupos, também vai depender dos impedimentos estéricos nos polímeros.

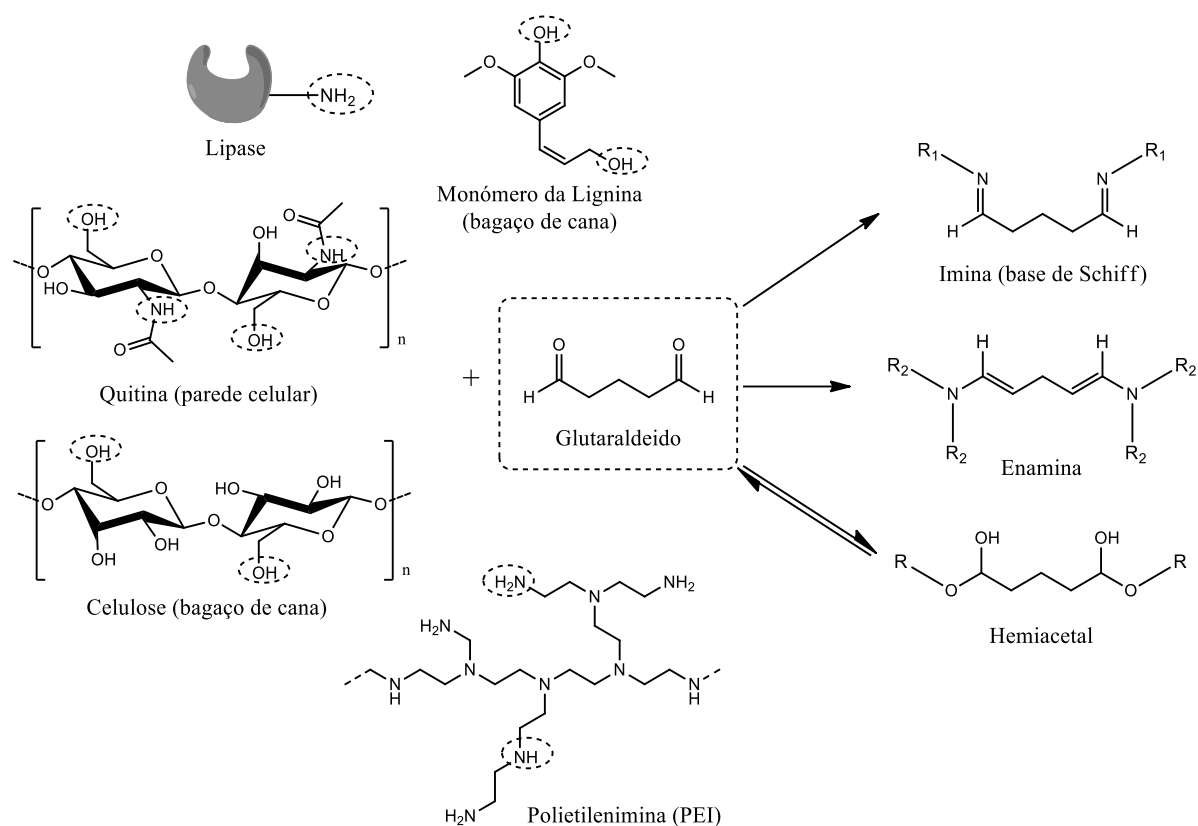


FIGURA 10 – ESQUEMA DOS POSSÍVEIS GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NAS LIPASES, PAREDE CELULAR, SUPORTE E POLIETILENIMINA QUE PODEM REAGIR COM GLUTARALDEÍDO DURANTE O ENTRECruzAMENTO DAS LIPASES E CÉLULAS INTEIRAS NO SÓLIDO FERMENTADO.

R_1 : substituinte de amino primário, R_2 : substituinte de amino secundário, R : substituinte de hidroxila.

FONTE: O autor (2016).

Nessa ordem de ideias, foi desenvolvido um estudo preliminar do efeito do tratamento dos sólidos fermentados com glutaraldeído (GA) como agente promotor de possíveis de ligações cruzadas covalentes entre as lipases, as células inteiras, o suporte (bagaço de cana) e a polietilenimina adicionada aos sólidos (PEI). Estes

experimentos foram feitos com o intuito de imobilizar ou reforçar a adsorção das lipases e células inteiras no sólido, para assim aumentar a estabilidade das lipases ante a inativação pelo etanol e para reduzir o efeito do glicerol adsorvido no sólido fermentado durante as reações de transesterificação. Isto poderia consequentemente melhorar a reutilização dos sólidos, por exemplo, possibilitando lavagens com água e não com solventes orgânicos para remover o glicerol retido.

8.1.1 Metodologia

Foram realizados três experimentos: dois de tratamento de sólidos fermentados secos: 1) com diferentes soluções de GA e 2) com PEI e depois com GA; e um de tratamento durante a FES, 3) incluindo PEI durante a fermentação e depois tratando esse sólido fermentado úmido com GA.

Todos os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL contendo 4 g dos sólidos fermentados secos (RMFS ou BCFS) em condições de reação de 25°C e 250 rpm.

Experimento 1.

Foram adicionados 40 mL de solução de GA 1,0 e 0,1% ($v v^{-1}$, preparada em tampão fosfato 0,020 M, pH 7,0) (BAN et al., 2002; ODA et al., 2005) ao sólido fermentado seco, e incubado durante 1 h. Depois do tratamento, foram realizadas lavagens em série a 4 °C com solução tampão fosfato 0,020 M, pH 7 (3 x 50 mL cada) e com água (3 x 50 mL cada), sendo os sólidos separados por filtração em uma camada dupla de tecido Perfex®. Foram retiradas alíquotas de 1 mL de cada filtrado, centrifugadas a 5000 $\times g$ durante 10 min, nas quais dosou-se a concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976), em leitor de microplacas iMark (BIO-RAD). As lavagens foram feitas até determinarem-se concentrações de proteína lixiviada menores que 10 $\mu g mL^{-1}$. O material sólido recuperado foi liofilizado e caracterizado (seção 4.2.4 no manuscrito) com relação às atividades lipolíticas residuais (relação porcentual entre a atividade do sólido após uma etapa ou tratamento e a atividade do sólido seco inicial, sem tratamento algum).

Amostras dos filtrados das duas primeiras lavagens nos experimentos de tratamento com GA 0,1% e 1,0% no RMFS, os quais apresentaram a maior concentração de proteína lixiviada, foram dialisadas e analisadas por SDS-PAGE 12%.

Experimento 2.

Foi realizado com um tratamento inicial do sólido com 40 mL de uma solução de PEI 1% (m v^{-1} , de pH ajustado a 7,0 com HCl 15%) (adaptado de HWANG et al., 2004) por 2 h. Depois foram adicionados 2 mL de solução 2,1% v v^{-1} de GA, para atingir assim a concentração final de 0,1%, incubando-se por mais 1 h. As lavagens e caracterizações foram realizadas como no anterior experimento.

Para os anteriores experimentos, os respectivos controles principais foram feitos com o RMFS e o BCFS tratados somente com solução tampão nas mesmas condições e submetido às lavagens. No segundo caso, mais um controle foi feito, tratando com a solução de PEI e sem a posterior adição do GA.

Experimento 3.

Foi realizada uma fermentação em estado sólido (seção 4.2.3 do manuscrito) incluindo na solução nutriente umedecedora a PEI (2% m v^{-1} em relação ao óleo de soja) e o sólido foi secado em coluna de ar seco. Depois, este sólido foi tratado com GA 0,1% como descrito no primeiro experimento, mas incluindo a adição de óleo de soja para a proteção do sítio ativo das lipases (2% m v^{-1} em relação à solução de GA), baseado na estratégia proposta por Lee et al. (2006). Foram feitos dois controles do sólido, a) com e b) sem a adição de PEI na fermentação, ambos tratados posteriormente só com tampão fosfato 0,02 M pH 7,0 e submetidos às lavagens.

8.1.2 Resultados e discussão

Nos tratamentos com GA (dos experimentos 1 e 2), com ou sem PEI, mesmo que foi observado que a proteína total lixiviada nos sólidos (RMFS e BCFS) tratados foi menor quando comparada com os respectivos controles, as atividades residuais

de hidrólise e de esterificação dos sólidos tratados (TABELA 4) foram menores com relação aos controles principais (controle 1).

TABELA 4 – (A) PROTEÍNA TOTAL LIXIVIADA E (B) ATIVIDADES LIPOLÍTICAS RESIDUAIS DOS SÓLIDOS FERMENTADOS DE *Rhizopus microsporus* (RMFS) E *Burkholderia contaminans* (BCFS), APÓS LAVAGENS DOS TRATAMENTOS COM POLIETILENIMINA (PEI) E GLUTARALDEIDO (GA).

(A)

Tratamento:		GA 1,0% ^a	GA 0,1% ^a	PEI 1% ^b + GA 0,1% ^a
Proteína total lixiviada:		(mg)	(mg)	(mg)
RMFS	Controle 1	28,3	16,8	15,1
	Controle 2	---	---	13,8
	Tratamento	16,0	13,5	16,1
BCFS	Controle 1	nd	17,5	28,6
	Controle 2	nd	---	19,7
	Tratamento	nd	12,3	22,9

(B)

Tratamento:		GA 1,0% ^a		GA 0,1% ^a		PEI 1% ^b + GA 0,1% ^a	
Atividade residual:		Hidrólise (%)	Esterificação (%)	Hidrólise (%)	Esterificação (%)	Hidrólise (%)	Esterificação (%)
RMFS	Controle 1	31	84	51	96	46	95
	Controle 2	---	---	---	---	15	19
	Tratamento	19	71	18	89	17	15
BCFS	Controle 1	nd	nd	72	83	68	85
	Controle 2	nd	nd	---	---	59	72
	Tratamento	nd	nd	57	93	35	78

^a % v v⁻¹. ^b % m v⁻¹. Controle 1: sólido tratado somente com solução tampão fosfato 0,02M pH 7,0. Controle 2: sólido tratado com solução de PEI 1% e sem posterior tratamento com GA 0,1%. nd: não determinado

A redução das atividades de hidrólise nos sólidos tratados foram menores que as de esterificação, o que poderia indicar: a) que provavelmente a maioria da proteína que foi desorvida durante o tratamento corresponde a lipases extracelulares com atividade de hidrólise, enquanto que as lipases ancoradas à membrana celular nas células inteiras que tiveram maior retenção no sólido seriam as responsáveis pela atividade de esterificação ou síntese (HAMA et al., 2006; SUN; XU, 2009) e b) há uma provável desnaturação das enzimas pelo GA, já que a estrutura terciária das lipases

pode ser alterada por excessivo entrecruzamento, tanto por ligações intramoleculares (em baixas concentrações de enzima e de GA), como por ligações com grupamentos amino de resíduos de lisinas comprometidas no sítio ativo das lipases (MIGNEAULT et al., 2004).

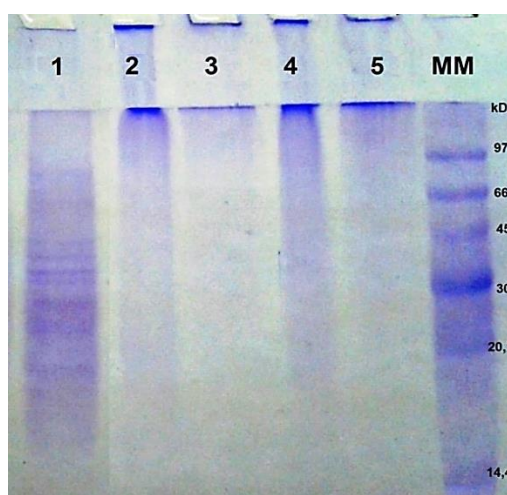


FIGURA 11 – SDS-PAGE DOS FILTRADOS DAS DUAS PRIMEIRAS LAVAGENS DO EXPERIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO POR TRATAMENTO COM GLUTARALDEÍDO NO SÓLIDO FERMENTADO DE *Rhizopus microsporus*.

Gel de empilhamento 6% e separador 12% (v v⁻¹) de acrilamida. Linhas: (1) Filtrado do controle, tratamento somente com tampão fosfato; (2,3) Primeiro e segundo filtrado do tratamento com glutaraldeído 0,1%; (4,5) Primeiro e segundo filtrado para glutaraldeído 1,0%; MM: Marcador de massa molecular.

No perfil eletroforético (FIGURA 11) das amostras dos filtrados das lavagens resultantes dos tratamentos do RMFS com GA (experimento 1), observa-se que as bandas de proteínas ficaram retidas no gel de empilhamento. Isto pode ser devido à formação de agregados enzimáticos de alta massa molecular, já que é bem descrito na literatura que as lipases podem formar ligações intra- e intermoleculares com GA, dependendo do controle do tempo de reação, o que pode deixar as lipases mais ativas ou menos ativas (BARBOSA et al., 2012a). Inclusive, a formação de agregados de enzimas por intercrossamento é utilizada como metodologia para a imobilização de enzimas (BARBOSA et al., 2012b; ZOU et al., 2014).

A estratégia de embeber o sólido fermentado com a solução de PEI antes do tratamento com GA (experimento 2) (D'SOUZA; KUBAL, 2002), baseia-se na hipótese de favorecer majoritariamente as ligações multipontuais entre todos os grupamentos amino do polímero (PEI) e as lipases, com o GA como ponte de ligação. Estas ligações

evitariam a dessorção e posterior agregação das lipases, graças a um possível entrelaçamento entre as fibras do bagaço de cana (celulose majoritariamente) e o polímero entrecruzado às lipases. No entanto, não se obteve este efeito positivo quando comparado com os controles nem com o tratamento com somente GA. Barbosa et al. (2012a) e Fernández-Lorente et al. (2006) adicionaram respectivamente etanol (30%) e detergente não iônico (0,5% Triton X-100) durante a imobilização por adsorção, com a finalidade de distanciar ou separar cada molécula para evitar a formação de agregados durante o posterior tratamento com glutaraldeído. Desta forma, fica aberta a possibilidade de apresentar esta estratégia como outra boa opção para evitar a agregação observada das lipases e impedir a sua dessorção.

A alternativa de incluir o PEI na fermentação em estado sólido (experimento 3) teve um efeito negativo quando a adição foi feita preliminarmente com 2% m v⁻¹ em relação à solução nutriente, porque não se observou crescimento do fungo. Portanto, foi decidido fazê-la com 2% m v⁻¹ em relação ao óleo de soja. Desta forma, no caso de *R. microsporus*, observou-se visualmente um crescimento mínimo do fungo após 18 h de fermentação, e por isso, o cultivo continuou por mais 22 h. No caso de *B. contaminans*, o cultivo ocorreu no tempo padrão de 72 h (seção 4.2.3 do manuscrito). O fato de o fungo demorar a crescer no meio com PEI indica que a inclusão do polímero no substrato da fermentação poderia requer novas curvas de crescimento e produção de lipases, já que os micro-organismos podem apresentar uma fase de latência mais prolongada ou uma fase exponencial menos pronunciada.

Já nas etapas de tratamentos dos sólidos, novamente foi observado o efeito negativo do GA, pois teve-se menor atividade residual de hidrólise em comparação com os controles (TABELA 5). A adição de óleo de soja para proteger as lipases dos sólidos durante ligações cruzadas não foi favorável ou foi insuficiente, já que não houve diferenças com os tratados somente com GA. Por outro lado, somente com a inclusão do PEI na fermentação e sem o tratamento com GA (PEI controle), evidenciou-se um efeito positivo na retenção da atividade de hidrólise. Obteve-se neste caso 81 % de atividade residual do RMFS depois do tratamento somente com tampão e as lavagens, mesmo tendo sido lixiviada uma maior concentração de proteína que no controle. Além disso, deve-se notar que RMFS obtido com PEI durante a fermentação teve uma atividade de 210 U g⁻¹SS, maior que a do RMFS sem

PEI 157 U g⁻¹SS (ambos secos e sem tratamento ou lavagens), o que deixa aberta a possibilidade de um estudo mais completo do favorecimento de atividade por adição de PEI ou do favorecimento da adsorção das lipases ao sólido com PEI durante a fermentação.

TABELA 5 – PROTEÍNA TOTAL LIXIVIADA E ATIVIDADE HIDROLÍTICA RESIDUAL DOS SÓLIDOS FERMENTADOS DE *Rhizopus microsporus* (RMFS) E *Burkholderia contaminans* (BCFS) COM POLIETILENIMINA (PEI) DURANTE A FERMENTAÇÃO, APÓS LAVAGENS DO TRATAMENTO COM GLUTARALDEIDO (GA).

	Tratamento	Atividade de hidrólise (U g ⁻¹ SS)	Atividade residual de hidrólise (%)	Proteína total lixiviada (mg)
RMFS	PEI ^a + GA ^b	48	31	16
	PEI + GA/óleo ^c	46	30	15
	PEI controle ^{**}	128	81	20
	Controle [*]	74	47	15
BCFS	PEI + GA	39	35	47
	PEI + GA/óleo	40	36	61
	PEI controle	65	58	66
	Controle	103	93	66

^a PEI 2% m v⁻¹. ^b GA 0,1% m v⁻¹. ^c óleo de soja 2% m v⁻¹. *Controle: sólido sem PEI durante a fermentação e tratado somente com solução tampão fosfato 0,02M pH 7,0. ** PEI Controle: sólido com PEI durante a fermentação e tratado somente com solução a tampão. Os cálculos de atividade residual foram feitos em relação às atividades dos sólidos fermentados secos e sem tratamentos, 157,2 U g⁻¹SS do RMFS e 111,1 U g⁻¹SS de BCFS.

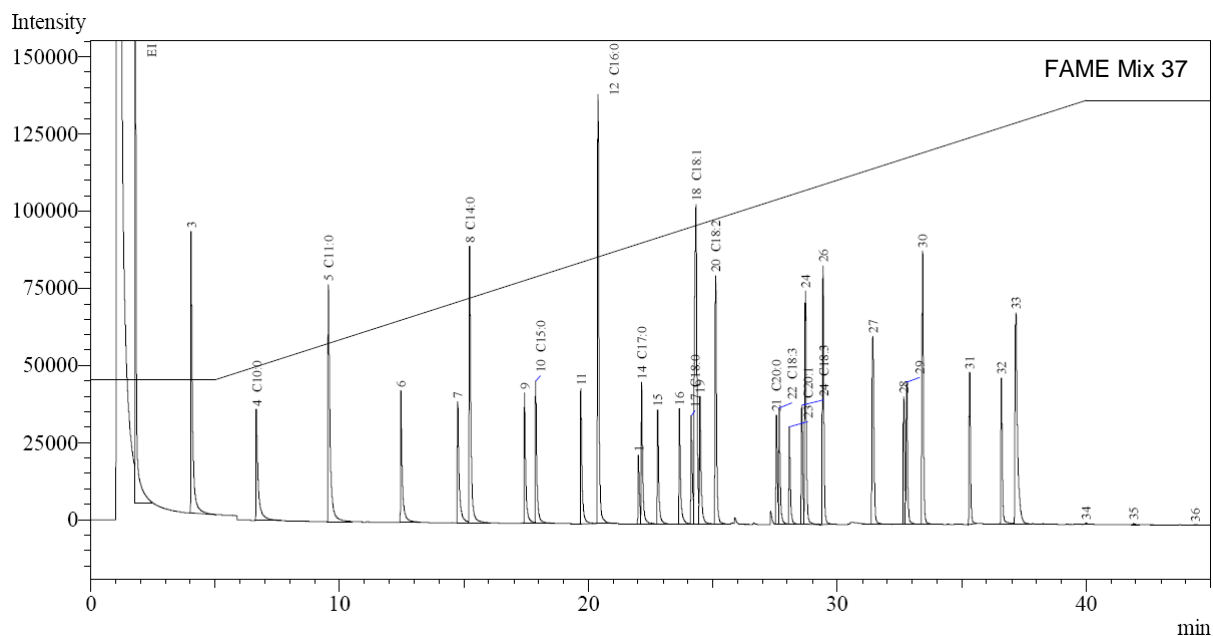
8.1.3 Conclusões

Em síntese, provavelmente não aconteceu ligação cruzada entre as lipases e o bagaço de cana (celulose e hemicelulose), dada a menor reatividade dos grupos hidroxila do polissacarídeo quando comparado aos grupos ε-amino presentes nas lipases (ver FIGURA 10, pag. 98). Provavelmente foi favorecida a ligação intermolecular das proteínas, que deu lugar à formação de agregados de lipases.

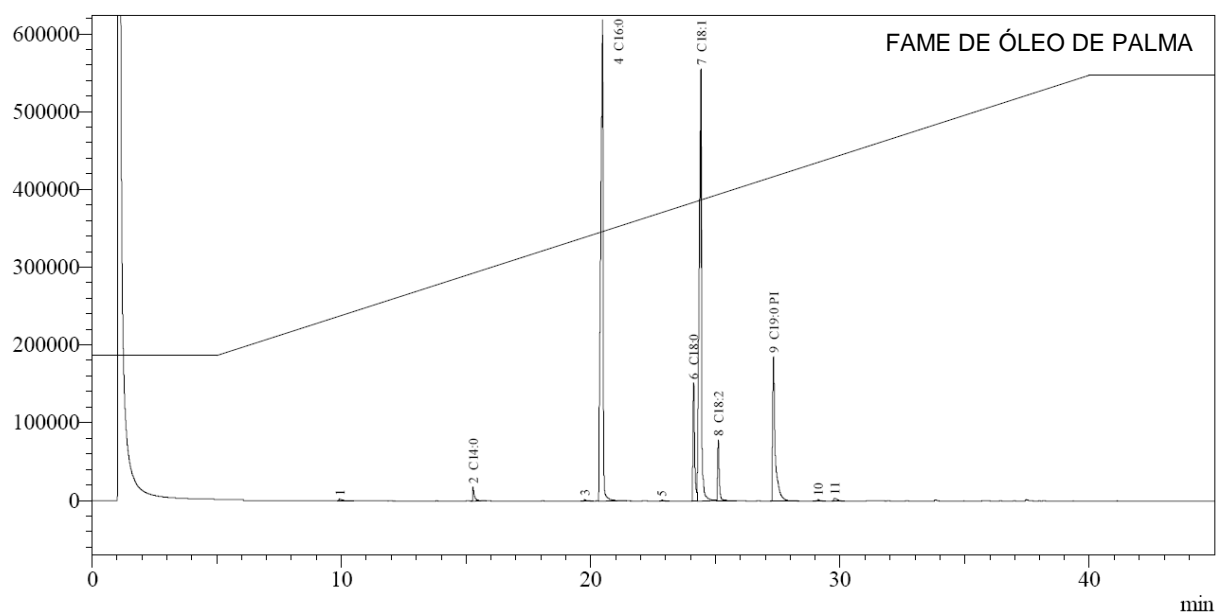
A estratégia com PEI revestindo o suporte tem ainda muitas probabilidades de dar mais resultados positivos de imobilização no RMFS, por um lado, estudando o aumento da atividade de hidrólise e a maior atividade residual após lavagens, e por outro lado, otimizando as condições (por exemplo, pH, concentração, tempo e temperatura) para uma reatividade favorável que garanta a reação dos grupamentos amino do polímero e ε-amino das lipases com os grupos aldeído do GA.

ANEXOS

A) CROMATOGRAMAS DA CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE PALMA POR COMPARAÇÃO COM O ESTANDAR FAME Mix 37

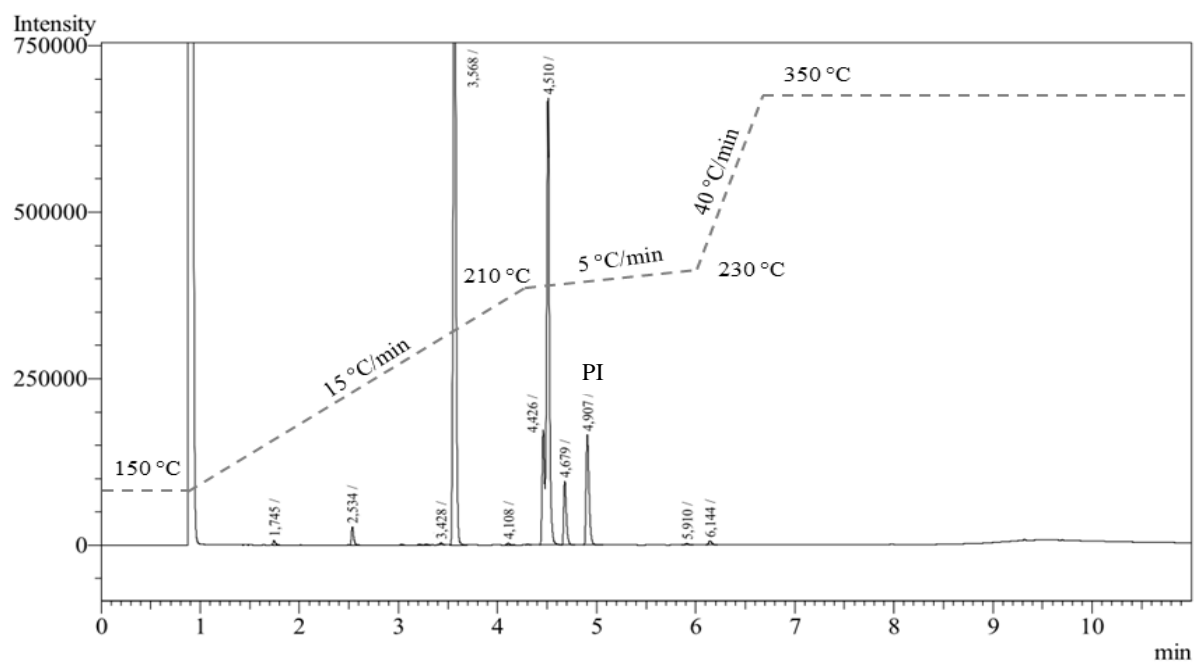


Cmpd Name	Ret.Time	Area
EI	1.802	619595
3	4.038	446815
4 C10:0	6.659	213663
5 C11:0	9.554	440640
6	12.466	205161
7	14.748	197032
8 C14:0	15.229	420472
9	17.433	183844
10 C15:0	17.882	195380
11	19.695	188390
12 C16:0	20.387	576524
1	22.006	87341
14 C17:0	22.137	192763
15	22.783	149847
16	23.656	163416
17 C18:0	24.131	142623
18 C18:1	24.323	701935
19	24.483	194796
20 C18:2	25.111	344149
21 C20:0	27.553	129331
22 C18:3	27.666	156445
23 C20:1	28.071	126471
24 C18:3	28.573	150076
24	28.718	334231
26	29.426	341695
27	31.429	323993
28	32.668	156352
29	32.789	190874
30	33.428	379015
31	35.317	200277
32	36.595	200347
33	37.176	466874
34	39.990	1780
35	41.905	2187
36	44.370	1127
Total		8825461



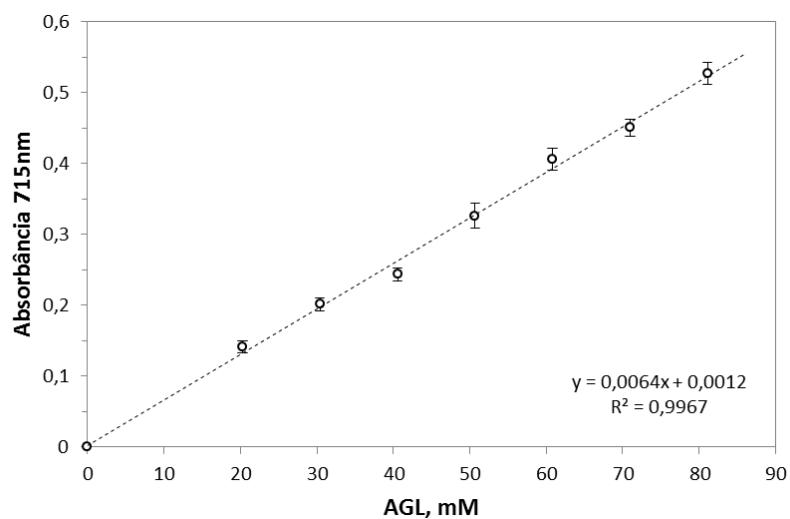
Cmpd Name	Ret.Time	Area
1	9,929	22132
2 C14:0	15,277	89126
3	19,759	12956
4 C16:0	20,472	4054625
5	22,849	7797
6 C18:0	24,127	702069
7 C18:1	24,419	3683105
8 C18:2	25,119	371859
9 C19:0 PI	27,334	1358373
10	29,121	11528
11	29,779	33992
Total		10347562

B) CROMATOGRAMA DA QUANTIFICAÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS PELA NORMA EN 14103 (2011)



*PI: padrão interno, nonadecanoato de metila (C19:0)

C) CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO OLÉICO PELO MÉTODO DE LOWRY-TINSLEY, NA DOSSAGEM DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO.



D) CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA PELO MÉTODO DE BRADFORD, EM LEITOR DE MICROPLACAS.

